

**Chemische, molekularbiologische
und biochemische Untersuchungen zur Biosynthese von
Mykotoxinen aus Ascomyceten**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Beate Wollinsky
aus Neustadt an der Weinstrasse

Marburg/Lahn, 2014

Erstgutachter: Prof. Dr. Shu-Ming Li

Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Keusgen

Eingereicht am 25. März 2014

Tag der mündlichen Prüfung am 14. Mai 2014

Hochschulkennziffer: 1180

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der
Philipps-Universität Marburg
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer
Creative Commons
Namensnennung
Keine kommerzielle Nutzung
Weitergabe unter gleichen Bedingungen
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|---|-----------|
| I. | Publikationsliste | 10 |
| II. | Posterpräsentationen | 11 |
| III. | Erklärung | 12 |
| IV. | Abkürzungsverzeichnis | 13 |
| V. | Zusammenfassung | 16 |
| VI. | Summary | 18 |
| 1. | Einleitung | 20 |
| 1.1. | Ascomycota | 20 |
| 1.2. | Die Gattungen <i>Aspergillus</i> und <i>Penicillium</i> | 21 |
| 1.2.1. | <i>Aspergillus fumigatus</i> | 22 |
| 1.2.2. | <i>Aspergillus nidulans</i> | 23 |
| 1.2.3. | <i>Neosartorya fischeri</i> | 24 |
| 1.2.4. | <i>Aspergillus versicolor</i> | 26 |
| 1.2.5. | <i>Penicillium commune</i> | 27 |
| 1.3. | Biosynthese prenylierter Indolderivate aus Ascomyceten | 28 |
| 1.3.1. | Biosynthese von Acetylaszonalenin in <i>N. fischeri</i> | 28 |
| 1.3.2. | Biosynthese von Fumigaclavin C bzw. Fumigaclavin A in <i>A. fumigatus</i> | 29 |
| | und <i>P. commune</i> | |
| 1.3.3. | Biosynthese von Alkaloiden des Fumitremorgin-Typs in <i>A. fumigatus</i> | 31 |
| | und <i>N. fischeri</i> | |
| 1.4. | Prenyltransferasen | 33 |
| 1.4.1. | Aromatische Prenyltransferasen | 33 |
| 1.4.2. | Die DMATS-Superfamilie | 36 |
| 1.5. | Zielsetzung der vorliegenden Arbeit | 43 |
| 2. | Material und Methoden | 45 |
| 2.1. | Chemikalien, Säulenmaterialien, Enzyme und Kits | 45 |
| 2.1.1. | Chemikalien | 45 |
| 2.1.2. | Säulenmaterialien | 47 |
| 2.1.3. | Enzyme, Kits und Antikörper | 47 |
| 2.2. | Plasmide, Primer, Bakterien- und Pilzstämmen | 48 |

| | | |
|--------|--|----|
| 2.2.1. | Plasmide | 48 |
| 2.2.2. | Primer | 51 |
| 2.2.3. | Bakterienstämme | 52 |
| 2.2.4. | Pilzstämme | 52 |
| 2.3. | Nährmedien..... | 53 |
| 2.3.1. | Nährmedien zur Kultivierung von Ascomyceten..... | 53 |
| 2.3.2. | Nährmedien zur Protoplastierung von <i>A. nidulans</i> CaW03 (<i>ftmPS</i>)..... | 54 |
| 2.3.3. | Nährmedien zur Kultivierung von <i>E. coli</i> | 56 |
| 2.3.4. | Nährmedien zur Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> | 56 |
| 2.4. | Antibiotika | 58 |
| 2.5. | Puffer und Lösungen | 59 |
| 2.5.1. | Puffer und Lösungen zur Isolierung von gDNA aus Ascomyceten..... | 59 |
| 2.5.2. | Lösungen zur Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> | 59 |
| 2.5.3. | Puffer und Lösungen zur DNA-Gelelektrophorese..... | 60 |
| 2.5.4. | Puffer zur Proteinaufreinigung aus <i>E. coli</i> | 60 |
| 2.5.5. | Puffer und Lösungen zur Proteinaufreinigung aus <i>S. cerevisiae</i> | 61 |
| 2.5.6. | Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE | 61 |
| 2.5.7. | Lösungen zur Western Blot-Analyse..... | 62 |
| 2.5.8. | Puffer und Lösungen zur Protoplastierung | 63 |
| 2.6. | Methoden der Mikrobiologie | 65 |
| 2.6.1. | Kultivierungsbedingungen für <i>E. coli</i> | 65 |
| 2.6.2. | Kultivierungsbedingungen für <i>S. cerevisiae</i> | 65 |
| 2.6.3. | Kultivierungsbedingungen für Ascomyceten | 65 |
| 2.6.4. | Herstellung einer Sporensuspension..... | 65 |
| 2.7. | Methoden der Molekularbiologie | 66 |
| 2.7.1. | Isolierung von gDNA aus Ascomyceten | 66 |
| 2.7.2. | Isolierung von mRNA aus <i>N. fischeri</i> NRRL181 und Herstellung von cDNA..... | 67 |
| 2.7.3. | Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> | 67 |
| 2.7.4. | Polymerase-Kettenreaktion (PCR)..... | 68 |
| 2.7.5. | Agarose-Gelelektrophorese | 68 |
| 2.7.6. | Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen..... | 69 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 2.7.7. | Restriktion von Plasmid-DNA | 69 |
| 2.7.8. | Partielle Restriktion von Plasmid-DNA | 69 |
| 2.7.9. | Ligation von DNA-Fragmenten | 70 |
| 2.7.10. | Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen..... | 71 |
| 2.7.10.1. | Herstellung CaCl_2 -kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen..... | 71 |
| 2.7.10.2. | Herstellung elektrokompeter <i>E. coli</i> -Zellen..... | 71 |
| 2.7.11. | Transformation von <i>E. coli</i> | 72 |
| 2.7.11.1. | Hitzeschocktransformation von CaCl_2 -kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen | 72 |
| 2.7.11.2. | Elektroporation von elektrokompenten <i>E. coli</i> -Zellen | 72 |
| 2.7.12. | Herstellung kompetenter <i>S. cerevisiae</i> -Zellen..... | 72 |
| 2.7.13. | Transformation von <i>S. cerevisiae</i> | 73 |
| 2.7.14. | DNA-Sequenzierung | 73 |
| 2.7.15. | Protoplastierung von <i>A. nidulans</i> CaW03 (<i>ftmPS</i>)..... | 73 |
| 2.7.16. | Transformation von <i>A. nidulans</i> CaW03 (<i>ftmPS</i>)..... | 74 |
| 2.8. | Methoden der Biochemie | 75 |
| 2.8.1. | Genexpression und Zellaufschluss..... | 75 |
| 2.8.1.1. | Genexpression in <i>E. coli</i> und Zellaufschluss | 75 |
| 2.8.1.2. | Expression von <i>ftmPT1</i> in <i>E. coli</i> | 75 |
| 2.8.2. | Gewinnung von Proteinrohextrakt aus <i>E. coli</i> -Zellen | 76 |
| 2.8.3. | Gewinnung von Proteinrohextrakt aus <i>S. cerevisiae</i> (<i>Mikrosomalfraktion</i>) | 76 |
| 2.8.4. | Reinigung von His-tag-Fusionsproteinen über Ni-NTA-Agarose | 77 |
| 2.8.5. | Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 77 |
| 2.8.6. | Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford..... | 78 |
| 2.8.7. | Western-Immunoblotting..... | 78 |
| 2.8.8. | Enzymassays mit <i>FtmPT1</i> | 79 |
| 2.8.9. | Enzymassays mit EAW19375, EAW19376, EAW19378, <i>FtmO</i> und <i>FtmP</i> | 80 |
| 2.8.10. | K_M -Wert-Berechnung..... | 80 |
| 2.9. | Methoden zur biologischen Charakterisierung..... | 81 |
| 2.9.1. | Zytotoxizitätstest | 81 |
| 2.9.2. | MTT-Färbung | 81 |
| 2.10. | Chemische Synthese..... | 81 |
| 2.10.1. | Synthese von <i>cyclo</i> -D-Trp-L-Pro und <i>cyclo</i> -D-Trp-D-Pro..... | 81 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| 2.11. | Isolierung von Sekundärmetaboliten aus Ascomyceten..... | 83 |
| 2.11.1. | Isolierung von Fumigaclavin A aus <i>Penicillium commune</i> NRRL2033..... | 83 |
| 2.11.2. | Isolierung von Sekundärmetaboliten aus <i>Neosartorya fischeri</i> NRRL181..... | 83 |
| 2.11.3. | Zufütterung von Tryprostatin B in <i>N. fischeri</i> NRRL181 | 84 |
| 2.11.4. | Kultivierung und Extraktion von Sekundärmetaboliten aus..... <i>A. nidulans</i> BW03 (<i>ftmPS</i> + <i>brePT</i>)..... | 85 |
| 2.12. | Analytische und spektroskopische Untersuchungen | |
| | niedermolekularer Substanzen | 85 |
| 2.12.1. | Analytische HPLC | 85 |
| 2.12.2. | Semipräperative HPLC | 86 |
| 2.12.3. | Massenspektrometrie (MS) | 87 |
| 2.12.4. | Kernresonanzspektroskopie (NMR)..... | 88 |
| 2.12.5. | Circulardichroismus (CD) | 88 |
| 3. | Ergebnisse | 89 |
| 3.1. | Synthese von <i>cyclo</i> -D-Trp-L-Pro und <i>cyclo</i> -D-Trp-D-Pro | 89 |
| 3.2. | Enzymatische Reaktionen mit der Prenyltransferase FtmPT1..... | 91 |
| 3.2.1. | Einleitung..... | 91 |
| 3.2.2. | Überproduktion von FtmPT1..... | 92 |
| 3.2.3. | Enzymassays zur Produktion von Tryprostatin B-Analoga | 92 |
| 3.2.4. | Zytotoxische Aktivität der Tryprostatin B-Analoga | 98 |
| 3.2.5. | Isolierung und Strukturaufklärung weiterer Produkte der | |
| | Prenyltransferase FtmPT1 | 101 |
| 3.2.5.1. | Strukturaufklärung der c -Reihe | 103 |
| 3.2.5.2. | Strukturaufklärung der d -Reihe..... | 111 |
| 3.2.6. | Unabhängige Produktbildung der b -, c - und d -Reihen..... | 113 |
| 3.3. | Isolierung von Naturstoffen | 117 |
| 3.3.1. | Einleitung..... | 117 |
| 3.3.2. | Isolierung von Fumigaclavin A aus <i>P. commune</i> NRRL2033 | 117 |
| 3.3.3. | Isolierung von Alkaloiden aus <i>N. fischeri</i> NRRL181 | 120 |
| 3.3.3.1. | Screening von <i>N. fischeri</i> NRRL181..... | 120 |
| 3.3.3.2. | Fraktionierung an Kieselgel und Isolierung von Sekundärmetaboliten | 123 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 3.3.3.3. | Isolierung und Strukturaufklärung von Fumitremorgin A, Acetylaszonalenin und Verruculogen aus der Kultivierungsbedingung 1 (Emerskultur, mCDH-Medium, 25 °C, 0 rpm) | 124 |
| 3.3.3.4. | Isolierung und Strukturaufklärung von Acetylaszonalenin und Fumitremorgin B aus der Kultivierungsbedingung 2 (Emerskultur, MEP-Medium, 37 °C, 120 rpm) | 129 |
| 3.3.3.5. | Isolierung und Strukturaufklärung von Acetylaszonalenin, 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C, 6-Methoxysprotryprostatin B und Spirotryprostatin A aus der Kultivierungsbedingung 3 (Emerskultur, PD-Medium, 37 °C, 120 rpm) | 132 |
| 3.3.3.6. | Isolierung und Strukturaufklärung von Aszonalenin, Verruculogen TR-2 und Substanz 15 aus der Kultivierungsbedingung 4 (Emerskultur, HA-Medium, 25 °C, 0 rpm) | 137 |
| 3.3.3.7. | Circulardichroismus (CD) von Aszonalenin und Acetylaszonalenin | 144 |
| 3.4. | Untersuchungen zur Biosynthese der isolierten Naturstoffe aus <i>N. fischeri</i> NRRL181 | 146 |
| 3.4.1. | Einleitung | 146 |
| 3.4.2. | Klonierung, Expression und Aufreinigung | 149 |
| 3.4.2.1. | Klonierung und Expression von <i>NFIA_093380</i> | 149 |
| 3.4.2.2. | Klonierung und Expression von <i>NFIA_093390</i> | 152 |
| 3.4.2.3. | Klonierung und Expression von <i>NFIA_093440</i> | 154 |
| 3.4.3. | Überproduktion von FtmO und FtmP | 159 |
| 3.4.4. | Versuche zum Nachweis der enzymatischen Aktivität von EAW19375, EAW19376, EAW19378, FtmO und FtmP | 160 |
| 3.4.5. | Zufütterung von Tryprostatin B | 161 |
| 3.5. | <i>In vivo</i> Produktion von Deoxybrevianamid E in <i>A. nidulans</i> TN02A7 | 164 |
| 3.5.1. | Einleitung | 164 |
| 3.5.2. | Klonierung von <i>brePT</i> in das pQE60-Konstrukt pCaW34 | 164 |
| 3.5.3. | Protoplastierung und Transformation von <i>brePT</i> in den <i>A. nidulans</i> CaW03 (<i>ftmPS</i>) Transformanten | 168 |
| 3.5.4. | Kultivierung von <i>A. nidulans</i> BW03 (<i>ftmPS</i> + <i>brePT</i>) | 171 |
| 4. | Diskussion | 173 |
| 4.1. | Zytotoxische Aktivität der Tryprostatin B-Analoga | 173 |
| 4.2. | Bildung von Nebenprodukten in Reaktionsansätzen mit FtmPT1 | 173 |
| 4.2.1. | Unabhängige Produktbildung der b -, c -, und d -Reihe | 174 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 4.2.2. | Hypothetischer Reaktionsmechanismus zur Bildung von C2- und C3 β -prenylierten Produkten durch die Prenyltransferase FtmPT1 | 175 |
| 4.2.3. | Hypothetischer Reaktionsmechanismus zur Bildung von N1-prenylierten Produkten durch die Prenyltransferase FtmPT1 | 177 |
| 4.3. | Isolierung von Fumigaclavin A aus <i>P. commune</i> NRRL2033..... | 178 |
| 4.4. | Biosynthese von Alkaloiden des Fumitremorgin-Typs aus <i>N. fischeri</i> NRRL181 | 179 |
| 4.4.1. | Biosynthese von Fumitremorgin A | 179 |
| 4.4.2. | Biosynthese von Verruculogen TR-2 | 180 |
| 4.4.3. | Biosynthese der Spirotryprostatine | 181 |
| 4.5. | <i>In vivo</i> Produktion von Deoxybrevianamid E in <i>A. nidulans</i> TN02A7..... | 185 |
| 5. | Referenzen | 187 |
| 6. | Anhang | 199 |
| 6.1. | NMR-Spektren der Syntheseprodukte | 199 |
| 6.2. | NMR und ESI-MS-Spektren der regulär C2-prenylierten FtmPT1 Produkte (b -Reihe)..... | 200 |
| 6.3. | NMR und ESI-MS-Spektren der regulär C3-prenylierten FtmPT1 Produkte (c -Reihe) | 216 |
| 6.4. | NMR und ESI-MS-Spektren der regulär N1-prenylierten FtmPT1 Produkte (d -Reihe)..... | 232 |
| 6.5. | K_M -Werte | 234 |
| 6.6. | NMR-Spektren des aus <i>P. commune</i> NRRL2033 isolierten Fumigaclavin A..... | 235 |
| 6.7. | NMR und ESI-MS-Spektren der isolierten Naturstoffe aus <i>N. fischeri</i> NRRL181 | 237 |
| 6.8. | HPLC-MS (Zufütterung) | 249 |
| VII. | Danksagung | 251 |
| VIII. | Curriculum vitae..... | 252 |

I. Puplikationsliste

Beate Wollinsky, Lena Ludwig, Xiulan Xie and Shu-Ming Li, 2012, Breaking the regioselectivity of indole prenyltransferases: identification of regular C3-prenylated hexahydropyrrolo[2,3-b]indoles as side products of the regular C2-prenyltransferase FtmPT1: Organic and Biomolecular Chemistry, 10(46) 9262-9270. (Originalarbeit)

Beate Wollinsky, Lena Ludwig, Alexandra Hamacher, Xia Yu, Matthias Kassack and Shu-Ming Li, 2012, Prenylation at the indole ring leads to a significant increase of cytotoxicity of tryptophan-containing cyclic dipeptides: Bioorganic and Medicinical Chemistry Letters, 22 3866-3869. (Originalarbeit)

Beate Wollinsky and Shu-Ming Li, 2012, Detection and purification of non-ribosomal peptide synthetase products in *Neosartorya fischeri*: Methods in Molecluar Biology, 944 111-119. (Buchkapitel)

Kathrin Mundt, Beate Wollinsky, Han-Li Ruan, Tianjiao Zhu and Shu-Ming Li, 2012, Identification of the verruculogen prenyltransferase FtmPT3 by a combination of chemical, bioinformatic and biochemical approaches: ChemBioChem, 13(17) 2583-2592. (Originalarbeit)

Marco Matuschek, Christiane Wallwey, Beate Wollinsky, Xiulan Xie and Shu-Ming Li, 2012, In vitro conversion of chanoclavine-I aldehyde to the stereoisomers festuclavine and pyroclavine controlled by the second reduction step: RSC Advances, 2 3662-3669. (Originalarbeit)

II. Posterpräsentationen

Beate Wollinsky, Xiulan Xie and Shu-Ming Li, Two products by one enzyme: Regular C2- and C3-prenylation by the prenyltransferase FtmPT1, 1st European Conference on Natural Products (Dechema), 22.-25. September 2013, Frankfurt am Main

Beate Wollinsky, Alexandra Hamacher, Matthias U. Kassack and Shu-Ming Li, Production of cytotoxic tryprostatin B analogues by using the prenyltransferase FtmPT1, Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), 18.-21. März 2012, Tübingen

III. Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Chemische, molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur Biosynthese von Mykotoxinen aus Ascomyceten“

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, 25.3.2014

(Ort, Datum)



(Beate Wollinsky)

IV. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------------|--|
| <i>A. clavatus</i> | <i>Aspergillus clavatus</i> |
| <i>A. fumigatus</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> |
| Acc. | accession number (Kennnummer) |
| Ala | Alanin |
| Amp ^R | Ampicillin-Resistenz |
| <i>A. nidulans</i> | <i>Aspergillus nidulans</i> |
| AMM | Aspergillus Minimal Medium |
| APS | Ammoniumperoxidsulfat |
| BCIP | 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat |
| bidest. | Bidestilliert |
| BLAST | Basic Local Alignment Search Tool |
| bp | Basenpaar |
| br s | breites Singulett |
| c | Konzentration |
| Cam ^R | Chloramphenicol-Resistenz |
| Carb | Carbenicillin |
| CD | Circulardichroismus |
| cDNA | komplementäre DNA |
| COSY | Correlation Spectroscopy |
| d | Duplett |
| Da | Dalton |
| dd | Duplett vom Duplett |
| DMAPP | Dimethylallyldiphosphat |
| DMSP | Dimethylallyl-S-Thioldiphosphat |
| DMATS | Dimethylallyltryptophansynthase |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Deoxyribonuclease (Desoxyribonuklease) |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| dt | Duplett vom Triplet |
| DTT | 1,4-Dithiothreitol |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ESI | Elektrospray Ionisation |
| <i>et al.</i> | und andere |
| FAD | Flavinadenindinukleotid (oxidiert) |
| FMN | Flavinmononukleotid |
| gDNA | genomische DNA |
| GMM | Glucose Minimal Medium |
| <i>gpdA</i> | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| h | Stunde |
| His ₆ | Hexahistidin |
| His ₈ | Octahistidin |
| HMBC | heteronuclear multiple bond correlation |

| | |
|--------------------------|--|
| HPLC | High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) |
| HSQC | heteronuclear single-quantum correlation |
| Hz | Hertz |
| IPTG | Isopropyl- β -Thiogalactopyranosid |
| J | Kopplungskonstante |
| k_{cat} | Wechselzahl |
| Kan ^R | Kanamycin-Resistenz |
| kb | Kilobasen |
| KF | Kulturfiltrat |
| KG | Kieselgelfraktion |
| K_M | Michaelis-Menten-Konstante |
| l | Liter |
| IC ₅₀ | mittlere inhibitorische Konzentration (half maximal inhibitory concentration) |
| IU/ml | International Units pro Milliliter |
| <i>lacZ</i> | β -Galaktosidase-Gen |
| LB | Lysogeny broth |
| M | molar |
| m | Multiplett |
| mAU | milli absorptions units |
| min | Minute |
| mRNA | RNA messenger RNA |
| MIC | Minimale inhibitorische Konzentration (minimal inhibitory concentration) |
| MS | Massenspektrometrie |
| MTT | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide |
| m/z | Masse-zu-Ladung-Verhältnis |
| NAD ⁺ /NADH | Nikotinamadenindinucleotid (oxidierte/reduzierte Form) |
| NADP ⁺ /NADPH | Nikotinamadenindinucleotidphosphat (oxidierte/reduzierte Form) |
| NBT | Nitroblau-Tetrazoliumchlorid |
| <i>N. fischeri</i> | <i>Neosartorya fischeri</i> |
| Ni-NTA | Nickel-Nitriloacetat |
| NMR | Kernspinresonanz-Spektroskopie (nuclear magnetic resonance) |
| NOESY | homonuclear two-dimensional nuclear Overhauser effect spectroscopy |
| NRPS | nichtribosomale Peptidsynthetase |
| OD | Optische Dichte |
| ORF | Offenes Leseraster (open reading frame) |
| <i>P. commune</i> | <i>Penicillium commune</i> |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction) |
| PPi | Pyrophosphat |
| ppm | parts per million |
| PT | Prenyltransferase |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| RNA | Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure) |
| RNase | Ribonuclease (Ribonuklease) |
| RP | Umkehrphase (reversed-phase) |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (rotations per minute) |

| | |
|----------------------------|---|
| s | Singulett |
| <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| SDS | sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat) |
| SDS-PAGE | Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) |
| sec | Sekunde |
| t | Triplett |
| R _t | Retentionszeit |
| td | Triplett vom Duplett |
| TAE | Tris-EDTA-Acetat |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin |
| TFA | Trifluoressigsäure (trifluoro acetic acid) |
| Tris | 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol |
| <i>TrpC_{term}</i> | Terminator von <i>Aspergillus nidulans</i> (Tryptophan Synthase) |
| U | Unit |
| UV | ultraviolett |
| v/v | volume per volume |
| V | Volt |
| w | Masse (weight) |
| W | Watt |
| x g | Erdbeschleunigung |
| X-Gal | 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactosid |

V. Zusammenfassung

Zum besseren Verständnis der biologischen Diversität von Naturstoffen aus verschiedenen Mikroorganismen ist es wichtig, deren Biosynthese aufzuklären. Durch bioinformatische Analysen weiß man, dass in den meisten Fällen die Biosynthesegene aus Mikroorganismen in einem Cluster im Genom liegen. Aufgrund der Strukturen der Naturstoffe ist es demnach möglich, deren Biosynthesegene aufzudecken und zu identifizieren. Nach gelungener Identifikation der Cluster ist es nun möglich die Biosynthese gezielt zu modifizieren und somit neue Substanzen mit vorher festgelegter Struktur mittels chemoenzymatischer Synthese mit rekombinanten Enzymen oder aber auch durch genetische Manipulation in Modelorganismen zu erhalten.

Im Zuge dieser Arbeit wurde hierfür zunächst das rekombinante Protein FtmPT1 aus der bekannten Biosynthese von Verruculogen in *E. coli*-M15-Zelle überproduziert und mittels Ni-NTA-Agarose aufgereinigt. Zusätzlich wurden die vier Stereoisomere von *cyclo*-Trp-Pro und *cyclo*-Trp-Ala synthetisiert, um sie später zusammen mit sechs weiteren zyklischen Dipeptiden mittels chemoenzymatischer Synthese mit FtmPT1 und DMAPP an Position C-2 zu prenylieren. In Kooperation mit Prof. Kassack aus Düsseldorf wurden die 14 chemoenzymatisch hergestellten Tryprostatin B-Analoga auf ihre Zytotoxizität gegenüber verschiedenen Zelllinien untersucht. Dabei ließ sich feststellen, dass die prenylierten Substanzen, bis auf ein paar Ausnahmen, eine ähnliche zytotoxische Aktivität gegenüber einer Zelllinie aufwiesen, wobei alle prenylierten Diketopiperazine eine deutlich höhere zytotoxische Aktivität als ihre unprenylierten Substrate aufwiesen. Dies deutet darauf hin, dass die Prenyl-Einheit essentiell für die biologische Aktivität ist, die Prolin-Einheit in Tryprostatin B dagegen nicht. Des Weiteren wiesen in den von Prof. Kassack durchgeführten Assays alle vier getesteten Stereoisomere von *cyclo*-Trp-Pro und *cyclo*-Trp-Ala ähnliche IC_{50} -Werte gegenüber den getesteten Zelllinien auf. Dies spricht nun dafür, dass die Stereochemie an C-11 und C-14 der Diketopiperazine sowie deren Substituenten ebenfalls keinen großen Einfluss auf die Zytotoxizität nehmen.

Im Zuge der Isolierung der C2-prenylierten Diketopiperazine wurden in den HPLC-Chromatogrammen zusätzliche Produktpeaks entdeckt, welche ebenfalls mittels semipräparativer HPLC isoliert wurden. Die Strukturen wurden anschließend mittels ESI-MS- und NMR-Spektroskopie als reguläre C3- und reguläre N1-prenylierte Produkte identifiziert, wobei L-tryptophanhaltige zyklische Dipeptide mit FtmPT1 zu C3 β -prenylierten Diketopiperazinen umgesetzt wurden und D-tryptophanhaltige zyklische Dipeptide zu C3 α -prenylierten Diketopiperazinen, so dass in beiden Fällen eine *syn-cis* Konfiguration vorlag. Basierend auf der bekannten FtmPT1 Struktur wurden daraufhin Reaktionsmechanismen postuliert und mittels Zeitabhängigkeitsassays sowie durch Bestimmung von K_M -Werten eine voneinander unabhängige Produktbildung bestätigt.

Neben der chemoenzymatischen Produktion der Tryprostatin B-Analoga wurde, ebenfalls mittels semipräparativer HPLC, Fumigaclavin A aus *P. commune* NRRL2033 isoliert. Durch Aufklärung der Stereochemie mittels NOESY-Spektroskopie als (8R,9S)-Fumigaclavin A konnte Pyroclavin, ebenfalls mit 8R-Konfiguration, als Vorstufe der Biosynthese von Fumigaclavin A identifiziert werden. Durch die Isolierung von Fumitremorgin A aus *N. fischeri* NRRL181 konnte der letzte Schritt in der Biosynthese von Fumitremorgin A in *N. fischeri* NRRL181 identifiziert werden. Zusätzlich zu Fumitremorgin A konnten neun weitere Naturstoffe aus *N. fischeri* NRRL181 isoliert und deren Struktur mittels ESI-MS- und NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden. Hierbei handelt es sich unter anderem um Aszonalenin und Acetylaszonalenin, welche von einem bekannten Cluster aus *N. fischeri* NRRL181 synthetisiert werden. Die Vorstufen 12,13-Dihydroxyfumitremogin C, Fumitremorgin B und Verruculogen in der Biosynthese von Fumitremorgin A wurden ebenfalls isoliert. Neben diesen sechs Indolalkaloiden mit bekannter Biosynthese wurden vier weitere Alkaloide des Fumitremorgin-Typs aus *N. fischeri* NRRL181 isoliert, deren Biosynthese zu Beginn dieser Arbeit noch nicht aufgeklärt werden konnte. Hierbei handelt es sich um Verruculogen TR-2, Spirotryprostatin A, 6-Methoxyspirotryprostatin B und Substanz 15, wobei Spirotryprostatin A und 6-Methoxyspirotryprostatin B zum ersten Mal aus *N. fischeri* NRRL181 isoliert werden konnten und es sich bei Substanz 15 um einen neuen Naturstoff handelt.

Da die Prenyltransferase FtmPT3, anders als erwartet, nicht im Biosynthesecuster von Verruculogen identifiziert wurde, sondern auf einem anderen Chromosom, wurde vermutet, dass die benachbarten Gene von FtmPT3 für die Biosynthese der im Rahmen dieser Arbeit isolierten Verbindungen aus *N. fischeri* NRRL181 verantwortlich sein könnten. Deswegen wurden drei Gene ausgesucht, welche mittels PCR aus gDNA bzw. cDNA amplifiziert und anschließend in verschiedene Expressionsvektoren (pQE60, pQE70, pHis8, pYES2/NT C) kloniert wurden. Durch heterologe Genexpression in *E. coli*- bzw. *S. cerevisiae*-Zellen und Aufreinigung der überproduzierten Proteine konnten verschiedene Enzymassays mit unterschiedlichen Cofaktoren und Substraten durchgeführt werden. Jedoch konnte in keinem der getesteten Assays ein Produktpeak mittels analytischer HPLC detektiert werden.

Zusätzlich sollte durch Transformation des Prenyltransferasegenes *brePT* in den Modelorganismus *A. nidulans* CaW03, in welchen bereits die NRPS FtmPS ektopisch integriert wurde, eine *in vivo* Produktion von Deoxybrevianamid E mittels HPLC detektiert werden. Dieser letzte Schritt der biologischen *in vivo* Synthese von Deoxybrevianamid E konnte jedoch nicht erfolgreich durchgeführt werden.

VI. Summary

To understand the biological diversity of natural products produced by different microorganism, it is very important to elucidate the biosynthesis of these products. In most cases, the biosynthetic genes are located as a cluster on the genome and can be identified by bioinformatic approaches. Based on the structure feature of natural products, it is possible to find the biosynthetic gene cluster in the genome sequence. After successful identification of a cluster in the genome sequence, it is possible to modify the original biosynthesis by chemoenzymatic synthesis or by genetic manipulations.

For that purpose, FtmPT1 in the biosynthesis of verruculogen was overproduced in *E. coli* M15 cells and purified with Ni-NTA-Agarose. In addition, the four stereoisomers of *cyclo*-Trp-Pro and *cyclo*-Trp-Ala were synthesised by chemical synthesis. These and further six cyclic dipeptides were subsequently incubated with the overproduced prenyltransferase FtmPT1, resulting in the formation of regularly C2-prenylated derivatives. These chemoenzymatically produced diketopiperazines were tested in cooperation with Prof. Kassack from Düsseldorf for their biological activities with their non-prenylated precursors as controls. The results showed that the cytotoxic effects of the prenylated diketopiperazines were significant higher than those of the non-prenylated precursors. This seems that the prenyl moiety, rather than the prolin moiety is essential for the biological activity. In addition, all tested stereoisomers of *cyclo*-Trp-Pro and *cyclo*-Trp-Ala showed comparable cytotoxic activities towards the tested cell lines. So the stereochemistry at C-11 and C-14 and the corresponding substituents have no significant influence on the cytotoxicity.

During the isolation of the C2-prenylated diketopiperazines, detailed analysis of the incubation mixtures of FtmPT1 revealed the presence of additional product peaks in the HPLC chromatograms. Seven regularly C3-prenylated hexahydropyrrolo[2,3- β] indoles and two regularly N1-prenylated diketopiperazines were isolated and identified by HR-ESI-MS and NMR analysis including HMBC, HSQC and NOESY experiments. L-tryptophan-containing cyclic dipeptides were converted to C3 β -prenylated diketopiperazines and D-tryptophan containing cyclic dipeptides to C3 α -prenylated diketopiperazines, so that in both cases a *syn-cis* configuration was generated. Based on the given crystal structure of FtmPT1, a putative reaction mechanism was proposed. The independent product formation was confirmed by time dependency assays and elucidation of K_M -values.

In addition to the chemoenzymatic production of tryprostatin B analogs the natural compound fumigaclavin A was isolated from *Penicillium commune* NRRL2033. The structure and stereochemistry of (8R,9S)-fumigaclavin A was confirmed by ESI-MS and NMR analysis including HMBC, HSQC and NOESY experiments. Isolation of fumitremorgin A from *N. fischeri* NRRL181 provided the evidence for its role as end product of the biosynthesis of fumitremorgins in this fungus. Furthermore nine natural products could be isolated from *N. fischeri* NRRL181 and identified via HR-ESI-MS and NMR analysis. First of all, the known products aszonalenin, acetylaszonalenin and the precursors of fumitremorgin A: 12,13-dihydroxyfumitremorgin C, fumitremorgin B and verruculogen. Four additional substances of the fumitremorgin-type with unknown biosynthetic pathways could be isolated from *N. fischeri* NRRL181. Via HR-ES-MS and NMR analysis, these compounds could be identified as verruculogen TR-2, spirotryprostatin A, 6-methoxyspirotryprostatin B and compound 15. Spirotryprostatin A and 6-methoxyspirotryprostatin B were first isolated from *N. fischeri* NRRL181 in this study and compound 15 has not been reported previously.

The prenyltransferase gene *ftmPT3* is not located in the known verruculogen-cluster at chromosome 8, but at a different chromosome. It was therefore speculated that the genes around *ftmPT3* could be responsible for the biosynthesis of verruculogen TR-2, spirotryprostatin A, 6-methoxyspirotryprostatin B or compound 15. Three genes were therefore amplified by PCR from gDNA or cDNA and were cloned into expression vectors (pQE60, pQE70, pHis8, pYES2/NT C). After heterologous gene expression in *E. coli* or *S. cerevisiae* and purification of the recombinant proteins, enzyme assays with different substrates and cofactors were carried out; unfortunately, no additional product peak could be detected in the HPLC chromatograms of the enzyme assays.

Transformation of the prenyltransferase gene *brePT* into *A. nidulans* TN02A7 containing the NRPS gene *ftmPS*, was used as a strategy for *in vivo* production of deoxybrevianamid E. Unfortunately, no expected product could be detected with HPLC.

1. Einleitung

1.1. Ascomycota

Die Pilzabteilung der Ascomycota stellt die größte Abteilung mit rund 75.000 bekannten Arten dar. Im Vergleich dazu besitzt die Abteilung der Oomycota rund 800, die Abteilung der Zygomycota rund 1000 und die Abteilung der Basidiomycota rund 30.000 bekannte Arten (Webster & Weber 2007). Wahrscheinlich ist jedoch erst ein Bruchteil aller auf der Erde vorkommenden Arten beschrieben worden. Ascomycota sind als saprotrophe, biotrophe (z.B. echter Mehltau) und nekrotrophe Parasiten, als Mykorrhizapilze (z.B. Trüffel) sowie als Symbionten in Flechten von Bedeutung (Alexopoulos *et al.*, 1996). Während es eine enorme morphologische Vielfalt bei den Ascomyceten gibt, ist allen Arten gemeinsam, dass sie sexuelle Sporen in einem Ascus (Schlauch) produzieren. Diese Asci werden entweder nackt produziert (Klasse Hemiascomycetes) oder sie sind zu Fruchtkörpern (Ascomata) zusammengeschlossen (Webster & Weber 2007). Asexuelle Reproduktion durch Conidien ist bei Ascomyceten ebenfalls weit verbreitet und kommt oft selbst dann vor, wenn keine Ascomata gebildet werden (siehe Abbildung 1-1). Man unterscheidet deswegen zwischen dem sexuellen Stadium (teleomorph) und dem asexuellen (imperfekten) Stadium (anamorph). Letzterem wird oft ein eigener Name gegeben. So tragen unterschiedliche Stadien desselben Pilzes oftmals verschiedenen Namen.

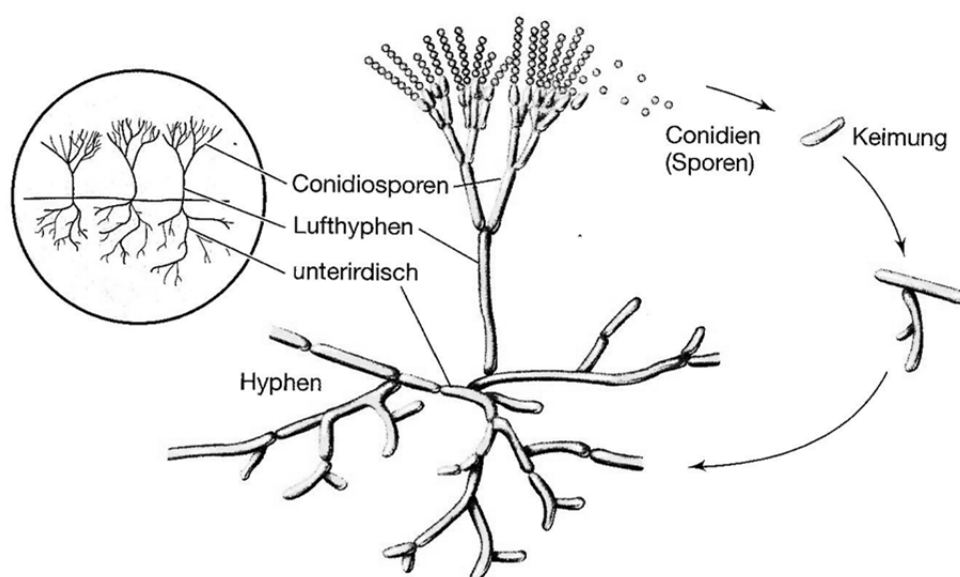


Abbildung 1-1: Schema des anamorphen Lebenszyklus eines Schimmelpilzes (Madigan & Martinko 2006)

Die Abteilung der Ascomycota kann man in drei Unterabteilungen, die Taphrinomycotina, Saccharomycotina und die Pezizomycotina einteilen. Zur letzteren Unterabteilung gehört unter anderem die Klasse der Eurotiomycetes mit der Unterklasse Eurotiomycetidae und der Ordnung der Eurotiales (Hibbett *et al.*, 2007). Zu dieser Ordnung gehört die Familie der Trichocomaceae mit den Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium*. Zur Zeit sind mehr als 250 verschiedene *Aspergillus*- und rund 58 *Penicillium*-Arten bekannt (Frisvad & Samson 2004; Geiser *et al.*, 2007). Da in dieser Arbeit mit Pilzen dieser beiden Gattungen gearbeitet wurde, werden diese im Folgenden genauer beschrieben.

1.2. Die Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium*

Die Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* weisen ein enormes Potential an biotechnologisch, industriell oder medizinisch genutzten Vertretern auf. So können beispielsweise Antitumormittel wie Taxol (*P. raistrickii*), Antimykotika wie Griseofulvin (*P. griseofulvum*), oder Antibiotika wie Penicillin (*P. notatum*, *P. chrysogenum*) aus ihnen isoliert werden (Bladt *et al.*, 2013). Zur industriellen Herstellung von beispielsweise Zitronensäure wird *A. niger* benutzt und auch in der Lebensmittelherstellung von Käse werden verschiedene Stämme wie z.B. *P. camberti* oder *P. roqueforti* eingesetzt. Um unter anderem die Stämme zu optimieren und zu untersuchen, wurden mittlerweile bereits 20 verschiedene *Aspergillus* Genome sequenziert (Cerqueira *et al.*, 2014). Einige Vertreter dieser Gattungen können jedoch auch opportunistische Krankheitserreger darstellen und starke Mycotoxine wie Patulin, Ochratoxine, Aflatoxine oder Gliotoxin produzieren (siehe Abbildung 1-2). Aufgrund dessen ist es umso wichtiger, die Biosynthesewege und Genome dieser Pilze zu untersuchen. Die Vertreter dieser beiden Gattungen, welche hier in dieser Arbeit relevant sind, werden im Folgenden genauer beschrieben.

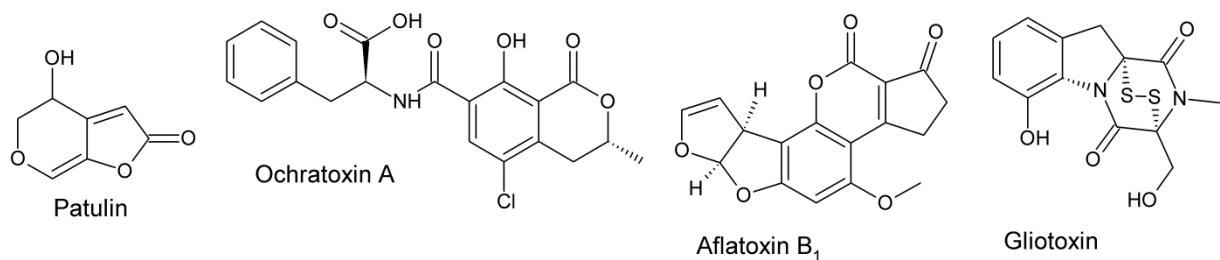


Abbildung 1-2: Ausgewählte Strukturen starker Mycotoxine einiger *Aspergillus*- und *Penicillium*-Arten

1.2.1. *Aspergillus fumigatus*

Der anamorphe Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* wurde bereits 1863 von Fresenius entdeckt und beschrieben (siehe Abbildung 1-3) (Fresenius 1863). Die sexuelle, teleomorphe Form wurde erst 2009 von Associate Prof. Dyer entdeckt und als *Neosartorya fumigata* bezeichnet (O'Gorman *et al.*, 2009). Das Genom von *A. fumigatus* wurde 2005 sequenziert und beinhaltet ca. 10.000 Gene auf 8 Chromosomen mit einer Länge von ca. 30 Mb (Nierman *et al.*, 2005). *A. fumigatus* gehört, wie schon erwähnt, zur Ordnung der Eurotiales und der Familie der Trichocomaceae. Er kann bei Temperaturen von 20 - 50 °C wachsen, wobei seine optimale Wachstumstemperatur bei 37 °C liegt (Shankar 2013). Der saprophytische Pilz ist weltweit stark verbreitet, in einer Langzeitstudie von 1963 - 1991 konnte im Mittel eine Conidienkonzentration von 45 - 110 Sporen pro Kubikmeter Raumluft gemessen werden, wobei die maximale Konzentration bei 100.000 Sporen pro Kubikmeter lag (Mullins 1994).

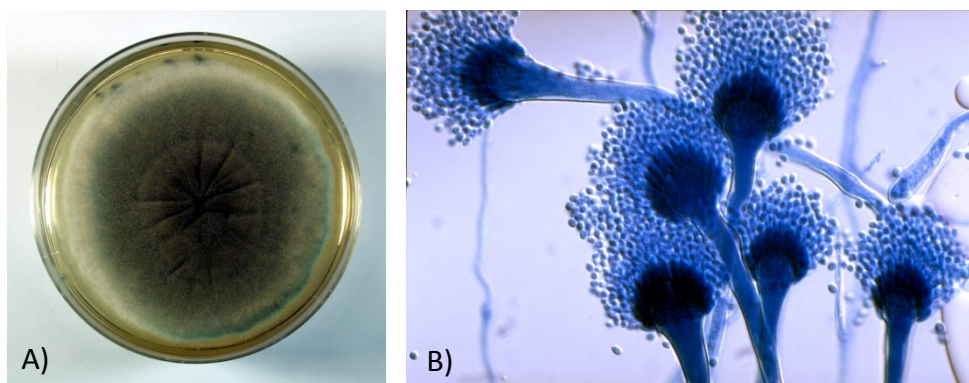


Abbildung 1-3: *Aspergillus fumigatus* A) Kultur auf Platte, 14 Tage B) Conidiophor (Photogenic Fungi Database [PFDB])

Diese starke Verbreitung macht ihn neben *Candida albicans* zu einem der bedeutendsten opportunistischen Krankheitserregern (Horn *et al.*, 2012). Er ist verantwortlich für tödliche invasive Infektionen, wie invasiver Aspergillose und steht in Verbindung mit Allergien, schwerem Asthma und Sinusitis (Brakhage 2005; Latge 1999; O'Gorman *et al.*, 2009). *A. fumigatus* produziert unter anderem das toxische Gliotoxin, welches eine bedeutende Rolle in der Pathogenität bzw. Infektion von *A. fumigatus* spielt (siehe Abbildung 1-2). Es wurde erstmals 1989 aus infiziertem Rindergewebe isoliert (Bauer *et al.*, 1989). Neben diesem Mykotoxin produziert *A. fumigatus* aber auch Fumigaclavin A und Verruculogen (siehe Abbildung 1-4). Auf die Biosynthese dieser beiden Mykotoxine wird unter 1.3. genauer eingegangen.

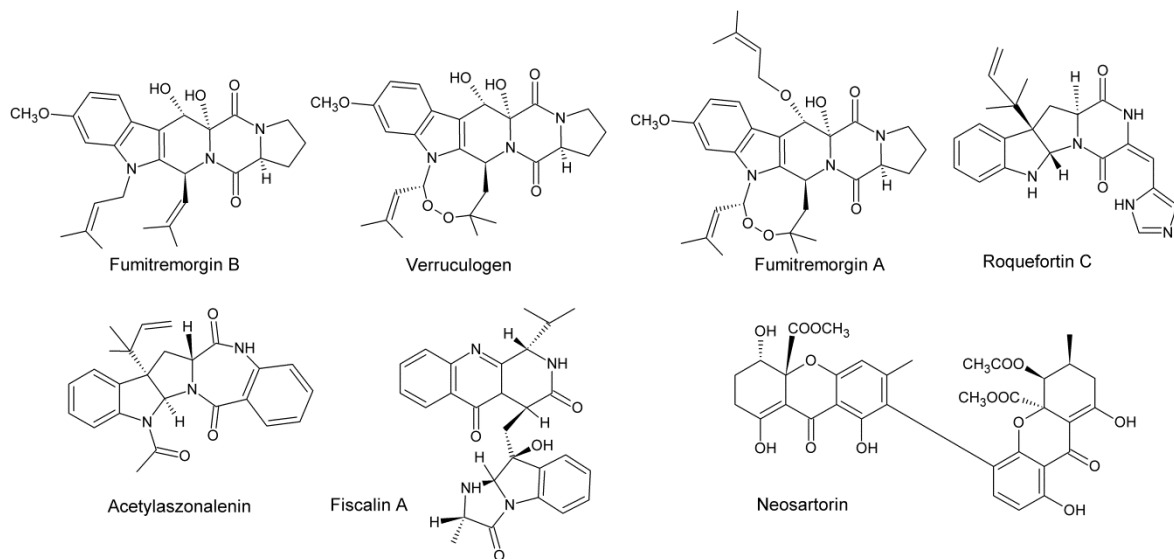


Abbildung 1-4: Ausgewählte Sekundärmetabolite und Mykotoxine einiger *Aspergillus*- und *Penicillium*-Arten

1.2.2. *Aspergillus nidulans*

Der anamorphe Ascomycet *Aspergillus nidulans* aus der Familie der Trichocomaceae wurde 1884 das erste Mal erwähnt und beschrieben (siehe Abbildung 1-5) (Winter 1884). Seine teleomorphe Form, auch *Emericella nidulans* genannt, wurde 43 Jahre später im Jahr 1927 entdeckt (Vuillemin 1927).

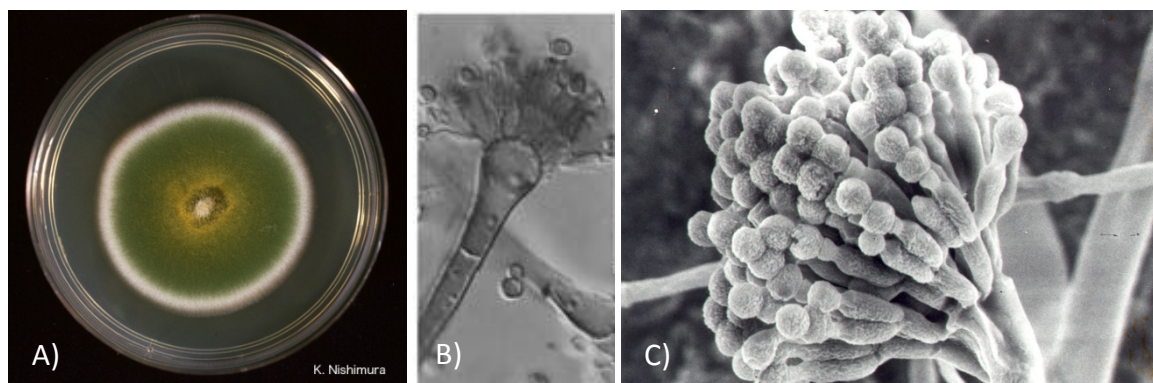


Abbildung 1-5: *Aspergillus nidulans* A) Kultur auf Platte, 14 Tage, 25 °C B) & C) Conidiophor (Hoog 2000)

In den 40er Jahren wurde *A. nidulans* von G. Pontecorvo in Glasgow als Modelorganismus etabliert (Krüger *et al.*, 1997). Grund dafür ist unter anderem seine leichte Kultivierbarkeit und schnelles Wachstum. Der entscheidende Vorteil von *A. nidulans* gegenüber anderen Schimmelpilzen ist jedoch, dass er auch einen sexuellen Vermehrungszyklus durchlaufen kann. Obwohl *A. nidulans* homothallisch ist (ein Partner ist für den sexuellen Zyklus nicht

nötig), können auch zwei genetisch verschiedene Stämme miteinander gekreuzt werden. Das Genom von *A. nidulans* besitzt eine Größe von ca. 30 Mb und ist auf 8 Chromosomen mit ca. 11.000 Genen verteilt (Cerqueira *et al.*, 2014; Galagan *et al.*, 2005). Die erste Transformation von *A. nidulans* gelang im Jahr 1983 von Ballance *et al.*, er transformierte das *pyr4* Gen von *N. crassa* um eine *pyrG* Mutation in *A. nidulans* hervorzurufen (Ballance *et al.*, 1983). Diese Mutation diente für spätere Transformationen als Selektionsmarker. So gelang kurz danach Tilburn *et al.* die Transformation des *amdS* Genes zur Acetamidase Produktion (Tilburn *et al.*, 1983). Um mehrere Gene durch Rekombination in das Genom integrieren zu können, wurden im Folgenden weitere Selektionsmarker durch Mutationen hergestellt, unter anderem *argB* (Berse *et al.*, 1983; John & Peberdy 1984). So können seit den 80er Jahren Gene durch DNA-Transformation in *A. nidulans* eingebracht und exprimiert oder auch gezielt ausgeschaltet werden, um anschließend den Phänotyp der transformierten Stämme sowie die Sekundärmetabolit Produktion zu studieren. Somit sind in *A. nidulans* alle Voraussetzungen gegeben, um biologische Fragen auf morphologischer, biochemischer, genetischer und molekularbiologischer Ebene zu untersuchen (Timberlake & Marshall 1989). Trotzdem wurden bis Anfang 2014 nur etwa 11% der potenziellen proteincodierenden Gene in *A. nidulans* verifiziert (www.aspergillusgenome.org). Das heißt, es steckt weiterhin ein enormes Potential an neuen Genen nicht nur in diesem Pilz, sondern auch in anderen Pilzen, welche für potenzielle neue und bedeutende Medikamente wie Antibiotika oder Zytostatika codieren könnten.

1.2.3. *Neosartorya fischeri*

Der Ascomycet *Neosartorya fischeri* ist ein weit verbreiteter Schimmelpilz, der bevorzugt in feuchter Umgebung und auf organischem Abfall wächst (siehe Abbildung 1-6) (Girardin *et al.*, 1995). Diese saprophytische Lebensweise ist, wie bereits erwähnt, bei Ascomyceten weit verbreitet. Durch seine hitzeresistenten Ascosporen kann er jedoch auch bei Temperaturen von 91 °C für knapp 2 min überleben, daher kann man *N. fischeri* auch auf hitzebehandelten Fruchterzeugnissen wie z.B. Säften antreffen (Beuchat.L.R. 1986). Die teleomorphe Art *N. fischeri* wurde erstmals 1972 von Mallach & Cain beschrieben und gehört, wie die bereits erwähnten Stämme *A. fumigatus* und *A. nidulans*, zur Familie der Trichocomaceae (Mallach & Cain 1972). Die anamorphe Form *Aspergillus fischerianus* wurde erstmal 1985 von Samson und Gams beschrieben, diese dominiert bei Temperaturen um 37 °C (Kozakiewicz 1989). Im

Gegensatz dazu dominiert die teleomorphe Form bei 24 °C. Beide Formen werden der Sektion Fumigati zugeordnet, diese beinhaltet insgesamt 17 sexuelle *Neosartorya* Spezies und fünf asexuelle *Aspergilli* Spezies (Gams *et al.*, 1985; Varga *et al.*, 2000).

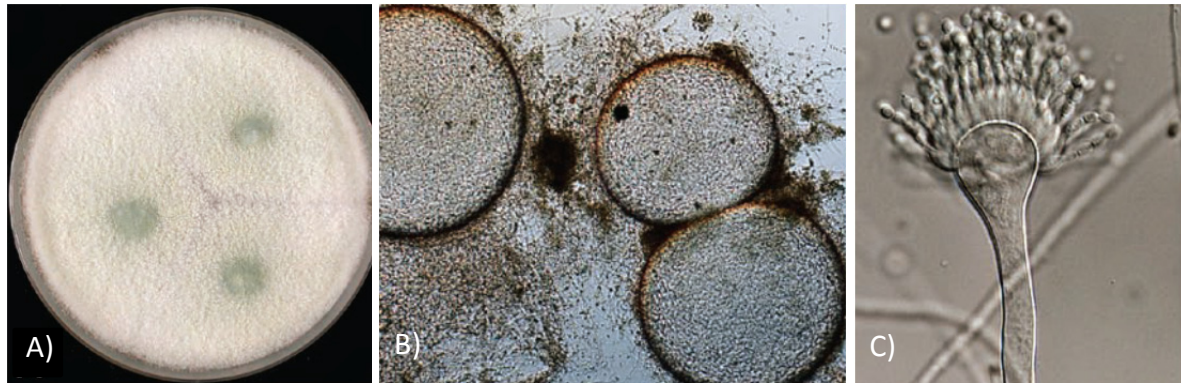


Abbildung 1-6: *Neosartorya fischeri*. A) Kultur auf Platte, 14 Tage, 25 °C B) Ascomata C) Conidiophor (Samson *et al.*, 2007)

N. fischeri produziert unter anderem Mykotoxine der Fumitremorgin-Gruppe (Verruculogen, Fumitremorgin A, B; siehe Abbildung 1-4). Nach Aufnahme der Toxine vom Säugerorganismus wirken diese auf das zentrale Nervensystem. Zuckungen und Krämpfe sind bei Schweinen und Schafen beschrieben, wobei das Mykotoxin Verruculogen am effektivsten ist (Nielsen *et al.*, 1988). *N. fischeri* wurde bisher nur sehr selten in Zusammenhang mit Infektionen bei Mensch und Tier beschrieben. So ist z.B. ein Fall von mykotischer Keratitis bei einem 62-jährigen Mann dokumentiert (Coriglione *et al.*, 1990). Neben den Mykotoxinen der Fumitremorgin-Gruppe wurden 1993 die Fiscaline A, B und C aus dem Kulturfiltrat von *N. fischeri* isoliert und 1998 Neosartorin aus dem Mycel (siehe Abbildung 1-4) (Proksa *et al.*, 1998; Wong *et al.*, 1993). Ein Xanthocillin Derivat NK372135s konnte 1994 isoliert und identifiziert werden (Morino *et al.*, 1994). Außerdem wurde 2009 Acetylaszonalenin aus *N. fischeri* isoliert (siehe Abbildung 1-4 und 1.3.1.) (Yin *et al.*, 2009b). Am interessantesten ist jedoch die Fumitremorgin-Gruppe und somit die Biosynthese von Fumitremorgin A, wobei bisher der letzte Schritt dieser Biosynthese nicht aufgeklärt wurde (siehe 1.3.3.). Das vollständige, ca. 32 Mb große Genom von *N. fischeri*, mit seinen 8 Chromosomen und ca. 11.000 Genen konnte vor 2008 vollständig sequenziert und annotiert werden (Fedorova *et al.*, 2008). Bis 2010 waren insgesamt 39 Gencluster mit 19 putativen nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) und 10 Prenyltransferasen der Dimethylallyltryptophansynthase (DMATS) Superfamilie aus *N. fischeri* bekannt (Khaldi *et al.*, 2010).

1.2.4. *Aspergillus versicolor*

Der anamorphe Ascomycet *Aspergillus versicolor* aus der Familie der Trichocomaceae wurde 1908 das erste Mal beschrieben (siehe Abbildung 1-7) (Tiraboschi 1908). Eine teleomorphe, sexuelle Reproduktion ist bisher jedoch nicht bekannt. Im Jahr 1926 wurden erstmals verschiedene Stämme zu einer *A. versicolor* Gruppe zusammengefasst. 1945 umfasste diese neue Gruppe vier Spezies und 1965 bereits 18 verschiedenen Arten, welche wiederum 1985 zu einer neuen Sektion namens Versicolores zusammengefasst wurden (Jurjevic *et al.*, 2012; Raper & Fennell 1965; Thom & Church 1926; Thom & Raper 1945). Die Mitglieder dieser Sektion wiederum wurden aufgrund immer neuer Erkenntnisse durch andere Untersuchungsmethoden oftmals neu zugeordnet. *A. versicolor* ist jedoch bis heute der bekannteste Vertreter dieser Sektion geblieben (Jurjevic *et al.*, 2012). So wurde er bereits aus dem Boden, der Luft, verschieden Nahrungsmitteln sowie aus übersalzigem Wasser isoliert (Domsch *et al.*, 1980; Mbata 2008; Pitt & Hocking 2009; Samson *et al.*, 2001).

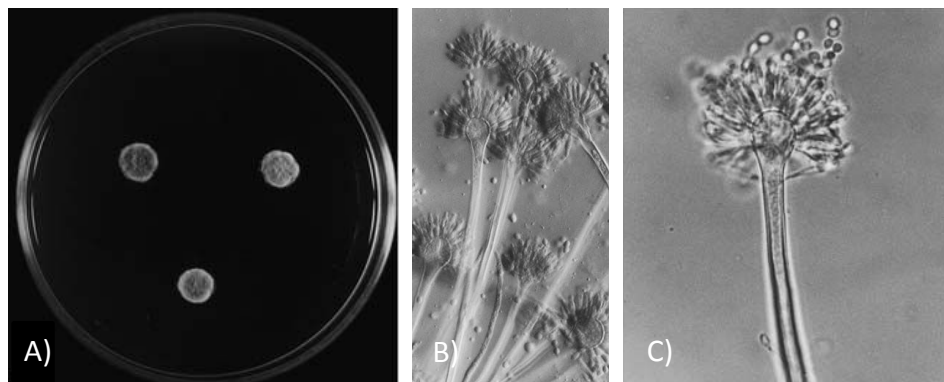


Abbildung 1-7: *Aspergillus versicolor* A) Kultur auf Platte, 7 Tage B) & C) Conidiophor (Samson *et al.*, 2004)

A. versicolor wird mit verschiedenen menschlichen und tierischen Gesundheitsproblemen in Verbindung gebracht, z.B. wird er für eine endogene Endophthalmitis (Augeninfektion) bei einem HIV-positiven Patienten verantwortlich gemacht (Perri *et al.*, 2005). Diese Pathogenität beruht unter anderem auf der Produktion des Mykotoxins Sterigmatocystin, einer Vorstufe des Aflatoxins B₁, der Pilz produziert aber auch Brevianamide und Notoamide (Finefield *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2009; Mills & Abramson 1986). Die Untersuchungen dieser Biosynthesewege bzw. Biosynthesecuster konnte durch die Sequenzierung im Jahr 2012 begonnen werden (www.aspergillusgenome.org).

1.2.5. *Penicillium commune*

Penicillium commune ist ein anamorpher Schimmelpilz der Ordnung *Eurotiales* und gehört ebenfalls in die Familie der *Trichocomaceae* (siehe Abbildung 1-8). Er ist weit verbreitet an warmen, feuchten Orten (Boden, Luft) und gedeiht auf Obst, Brot, Käse, Mehl, Marmeladen und Fruchtsäften. Er kann allergische Reaktionen wie z.B. Fließschnupfen, Husten, Nesselfieber oder Asthma auslösen (Frisvad *et al.*, 2004; Rundberget *et al.*, 2004). Erstmals beschrieben wurde *P. commune* im Jahr 1910 von Thom während seiner Studien über Schimmelkäse (Thom 1910). Eine sexuelle, teleomorphe Verbreitungsart wurde bisher nicht entdeckt.

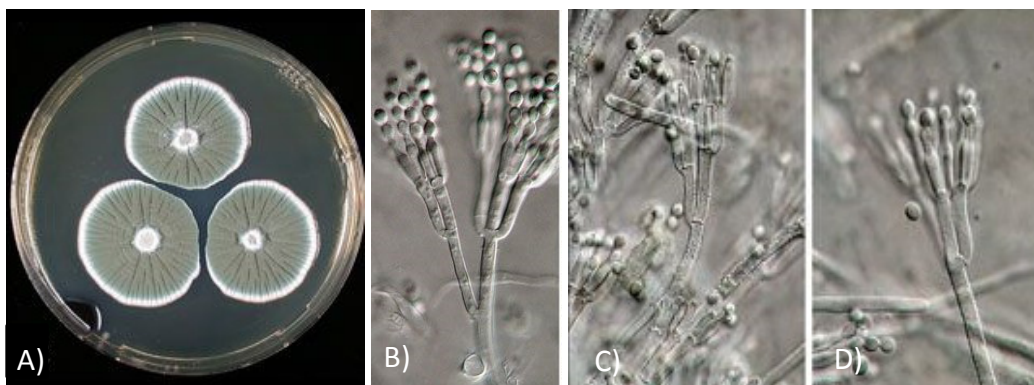


Abbildung 1-8: *Penicillium commune* A) Kultur auf Platte, 7 Tage B-D) Conidiophor (Frisvad & Samson 2004)

P. commune produziert verschiedene Mykotoxine, wie z.B. Cyclopiazonsäure und Rugulovasin A & B (Reshetilova *et al.*, 1995; Sosa *et al.*, 2002). Unter bestimmten Kulturbedingungen kann es jedoch auch zur Produktion des Neurotoxins Roquefortine und des tremorgenen Toxins Penitrem A sowie zur Produktion von Fumigaclavin A und B kommen (Vinokurova *et al.*, 2003a; Vinokurova *et al.*, 2003b; Wagener *et al.*, 1980).

1.3. Biosynthese prenylierter Indolderivate aus Ascomyceten

Zum besseren Verständnis der biologischen Diversität von Naturstoffen aus verschiedenen Mikroorganismen ist es wichtig, deren Biosynthese aufzuklären. Durch bioinformatische Analysen weiß man, dass in den meisten Fällen die Biosynthesegene in einem Cluster im Genom der Ascomyceten liegen (Li 2010). Aufgrund der Strukturen der Naturstoffe ist es folglich möglich, deren Biosynthesegene aufzudecken und zu identifizieren. Dies alles ist jedoch nur denkbar, da viele Gene der Ascomyceten keine oder wenige Introns besitzen, anders als z.B. Basidiomyceten. Dadurch können die Gene über mRNA oder gDNA mittels Fusions-PCR amplifiziert werden. Im Nachfolgenden werden einige Beispiele erläutert, bei denen aufgrund der Sekundärmetabolit-Produktion der Pilze deren Biosynthese aufgeklärt werden konnte.

1.3.1. Biosynthese von Acetylaszonalenin in *N. fischeri*

Als erstes Beispiel ist die Biosynthese des zyklischen Dipeptidderivates aus Tryptophan und Anthranilsäure: Acetylaszonalenin zu nennen. Aufgrund der Acetylierung an Position N-1 und Prenylierung an Position C-3 des Indolringes kann man davon ausgehen, dass mindestens drei Gene in die Biosynthese involviert sind. Zum einen eine nichtribosomale Peptidsynthetase (NRPS) für die Bildung des zyklischen Dipeptides, zum anderen eine Prenyltransferase für den Prenyltransfer und eine Acetyltransferase für den Acetyltransfer (Yin *et al.*, 2009b). Nach Sequenzanalysen und Homologievergleichen konnte ein putatives Gencluster im Genom von *N. fischeri* NRRL181 und ein orthologes Cluster in der Genomsequenz von *A. terreus* NIH2624 gefunden werden (siehe Abbildung 1-9) (Yin *et al.*, 2009b). Durch Klonierung der Gene und biochemischer Charakterisierung der rekombinanten Genprodukte konnte gezeigt werden, dass AnaPS tatsächlich für die Zyklisierung von L-Tryptophan und Anthranilsäure verantwortlich ist, AnaPT für den Prenyltransfer und die Zyklisierung zwischen dem Indol und Benzodiazepin Ringsystem und AnaAT für die Acetylierung von Aszonalenin. (siehe Abbildung 1-10) (Gao *et al.*, 2012; Yin *et al.*, 2009b).

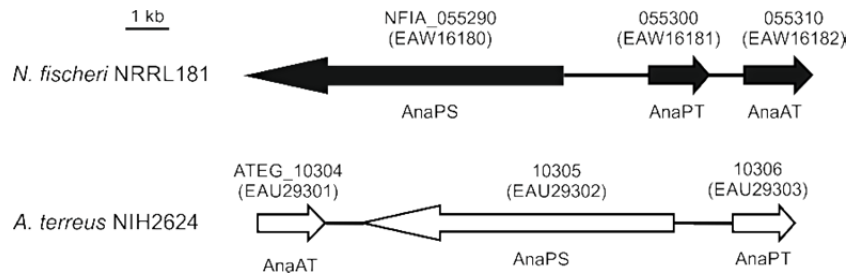


Abbildung 1-9: Acetylazonalenin Gencluster in *N. fischeri* NRRL181 und *A. terreus* NIH2624. Schwarze Pfeile bezeichnen Gene, deren Funktion experimentell bewiesen wurde.

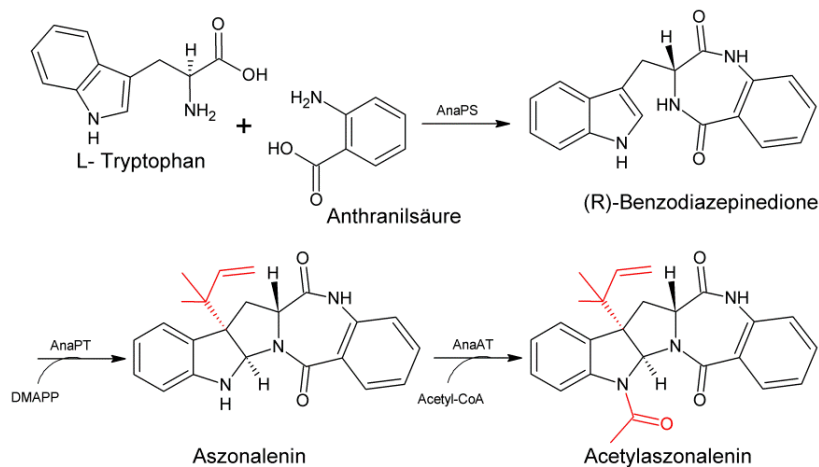


Abbildung 1-10: Acetylazonalenin-Biosynthese in *N. fischeri* NRRL181

1.3.2. Biosynthese von Fumigaclavin C bzw. Fumigaclavin A in *A. fumigatus* und *P. commune*

Das Biosynthesegencluster von Fumigaclavin C mit 11 Genen auf Chromosom zwei von *A. fumigatus* Af293 wurde durch Blastanalysen des *dmaW* Genes von *C. purpurea* gefunden (Unsöld & Li 2005). Zur Identifizierung des Biosynthesegenclusters in *P. commune* NRRL2033 wurde eine Cosmidbank mit genomischer DNA von *P. commune* NRRL2033 erstellt und sequenziert, welche ebenfalls mittels Blastanalysen auf homologe Gene von *dmaW* aus *C. purpurea* untersucht wurde. Hierbei konnte ein putatives Gencluster mit neun Genen auf einem der Cosmide identifiziert werden (siehe Abbildung 1-11) (Unsöld 2006). Die Biosynthese beginnt mit der Prenylierung von L-Tryptophan an Position C-4 des Indolrings zu 4-Dimethylallyl-L-Tryptophan (4-L-DMAT). Der zweite Schritt dieser Biosynthese, die N-Methylierung, wird durch die Methyltransferase FgaMT katalysiert (Rigbers & Li 2008). Zur

Bildung von Chanoclavin-I sind nun eine Decarboxylierung und zwei Oxidationsschritte nötig (Gröger & Floss 1998). Diese werden vermutlich von FgaOx1 und FgaCat katalysiert (Mai & Li 2013). Durch biochemische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Dehydrogenase FgaDH den nächsten Schritt zu Chanoclavin-I Aldehyd katalysiert (Wallwey *et al.*, 2010). Wie sich herausstellte, ist Chanoclavin-I Aldehyd der Verzweigungspunkt in der Ergotalkaloidbiosynthese nicht nur in *A. fumigatus* und *P. commune*, sondern auch in *C. purpurea* mit dem Endprodukt Ergotamin (Coyle *et al.*, 2010). Durch FgaOx3 und FgaFS wird nun in *A. fumigatus* Festuclavin und in *P. commune*, da in den *in vitro* Versuchen mit FgaOx3_{pc} und FgaFS_{pc} beide Produkte gebildet werden, Festuclavin oder Pyroclavin gebildet (Matuschek *et al.*, 2012). Die putative Cytochrom P450 Monooxygenase FgaP450-2 ist vermutlich für die Bildung von Fumigaclavin B zuständig (Mai & Li 2013). Durch die Acetyltransferase FgaAT bzw. FgaAT_{pc} wird der Transfer der Acetylgruppe von Acetyl-CoA auf Fumigaclavin B unter Bildung von Fumigaclavin A katalysiert (Liu *et al.*, 2009). Die zweite Prenyltransferase im *A. fumigatus*-Cluster ist schließlich für die letzte Prenylierung zu Fumigaclavin C zuständig (siehe Abbildung 1-12) (Unsöld & Li 2006).

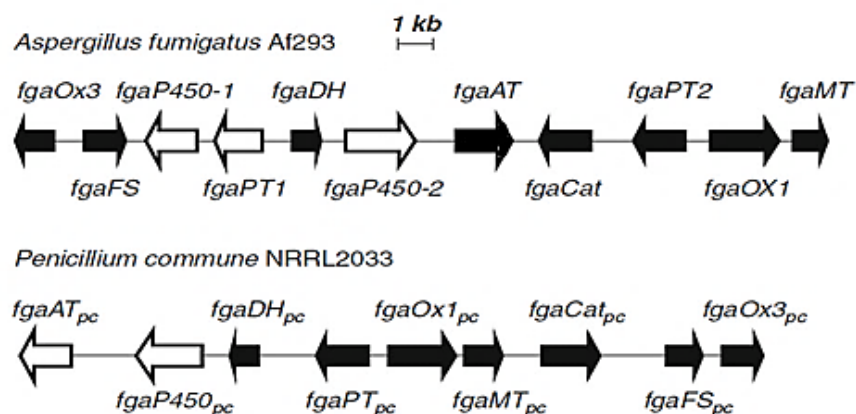


Abbildung 1-11: Fumigaclavin C bzw. A Gencluster in *A. fumigatus* Af293 und *P. commune* NRRL2033. Schwarze Pfeile bezeichnen Gene oder deren Orthologe, deren Funktion experimentell bewiesen wurde.

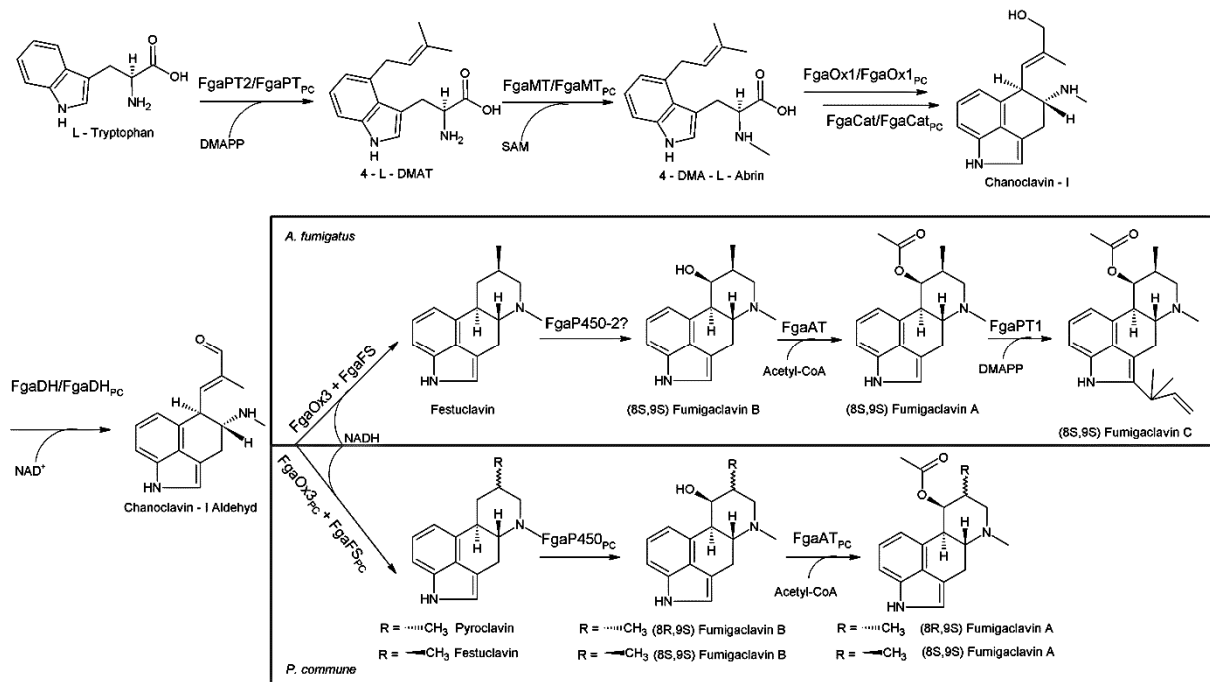


Abbildung 1-12: Biosynthese von Fumigaclavin C in *A. fumigatus* und Fumigaclavin A in *P. commune*

1.3.3. Biosynthese von Alkaloiden des Fumitremorgin-Typs in *A. fumigatus* und *N. fischeri*

Indolalkaloide des Fumitremorgin-Typs beinhalten neben Tryprostatinen und Fumitremorginen auch Cyclotryprostatine, Spirotryprostatine, Verruculogene und deren Derivate (Li 2011). Wobei bisher lediglich die Biosynthese von Verruculogenen in *A. fumigatus* Af293 bzw. A1163 und *N. fischeri* NRRL181 aufgeklärt werden konnte. Die für diese Biosynthese nötigen acht Gene liegen in *A. fumigatus* Af293 und A1163 sowie *N. fischeri* NRRL181 in einem Cluster auf Chromosom 8 (siehe Abbildung 1-13) (Grundmann & Li 2005). Der erste Schritt in der Biosynthese von Verruculogenen ist die Kondensation der zwei Aminosäuren L-Tryptophan und L-Prolin, katalysiert durch die NRPS FtmPS. Durch Expressionsversuche von *ftmPS* in *A. fumigatus* konnte die Bildung von Brevianamid F bestätigt werden (Maiya *et al.*, 2006). Das gebildete zyklische Dipeptid wird im Folgenden durch die Prenyltransferase FtmPT1 in Gegenwart von Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) an Position C-2 des Indolringes prenyliert (Grundmann & Li 2005). Durch anschließende Hydroxylierung von Tryprostatin B an Position C-6 durch das Cytochrom P450 Enzym FtmP450-1 und darauffolgender Methylierung durch die putative Methyltransferase FtmMT wird Tryprostatin A gebildet (Kato *et al.*, 2009). Die anderen beiden Cytochrom P450 Enzyme: FtmP450-2 und FtmP450-3 katalysieren die Zyklisierung von Tryprostatin A zu Fumitremorgin C durch Verknüpfung der Prenyleinheit an den Diketopiperazinring sowie die

Hydroxylierung zu 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C (Kato *et al.*, 2009). Die zweite Prenyltransferase FtmPT2 ist im Folgenden verantwortlich für die N-Prenylierung von 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C zu Fumitremorgin B (Grundmann *et al.*, 2008). Die Umsetzung zu Verruculogen wird durch die α -Ketoglutarat abhängige Dioxygenase FtmOx1 katalysiert (siehe Abbildung 1-14) (Steffan *et al.*, 2009). Die darauffolgende O-Prenylierung zu Fumitremorgin A konnte vor Beginn dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. Alle Gene im identifizierten Cluster, auch die benachbarten Gene *ftmO* und *ftmP* wurden untersucht, jedoch ohne Erfolg (Dissertationen Dr. Marco Matuschek und Dr. Alexander Grundmann).

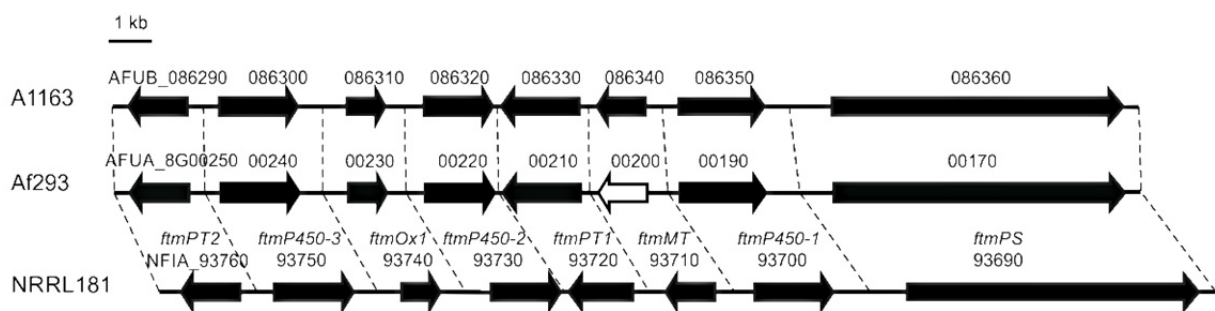


Abbildung 1-13: Verruculogen Gencluster in *A. fumigatus* Af293 und A1163 sowie *N. fischeri* NRRL181

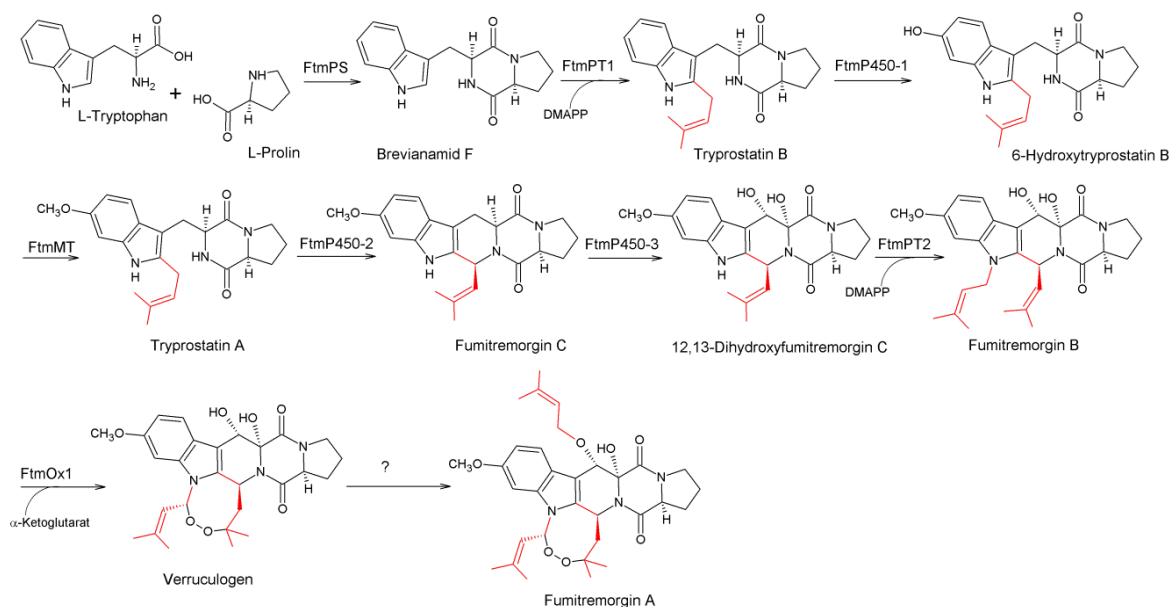


Abbildung 1-14: Biosynthese von Verruculogen. Die Prenyleinheiten wurden rot markiert.

1.4. Prenyltransferasen

Prenyltransferasen katalysieren den Transfer von Isopreneinheiten auf Akzeptormoleküle. Diese Akzeptormoleküle der verschiedenen Prenyltransferasen sind dabei namensgebend. So kann man die Prenyltransferasen in insgesamt drei Gruppen aufteilen. Zum einen in die Isoprenyl-Diphosphat-Synthasen (IPPS), welche, wie der Name schon verrät, durch Kondensation von allylischen Prenyldiphosphaten mit homoallylischen Isopentenylidiphosphat (IPP, C5) in die Biosynthese linearer Isoprenyl-Diphosphaten involviert sind (Liang *et al.*, 2002). Die zweite Gruppe schließt alle Protein-Prenyltransferasen ein, sie spielen eine wichtige Rolle in der posttranslationalen Modifikation von Proteinen in Eukaryonten, indem sie z.B. das Kohlenstoffgerüst FPP oder GPP auf Cysteinreste am oder in der Nähe des C-Terminus übertragen (Maurer-Stroh *et al.*, 2003). Durch Proteinprenylierungen wird unter anderem die Verankerung von Proteinen mittels hydrophober Isopreneinheiten in oder an Membranen ermöglicht. Dies erlaubt ihnen ihre biologische Funktion zu erfüllen, welche oft von der Lokalisierung in oder an der Membran abhängig ist (Nguyen *et al.*, 2010). Die dritte Gruppe umschließt alle aromatischen Prenyltransferasen. Da im Zuge dieser Arbeit mit Enzymen dieser Gruppe gearbeitet wurde, wird diese im Folgenden ausführlicher behandelt.

1.4.1. Aromatische Prenyltransferasen

Aromatische Prenyltransferasen katalysieren den Transfer von C5 (dimethylallyl), C10 (geranyl) oder C15 (farnesyl) Prenyl-Einheiten, ausgehend von den entsprechenden Isoprenyldiphosphaten an verschiedenen elektronenreichen aromatischen Akzeptoren (Tello *et al.*, 2008). Prenyltransferasen sind in der Biosynthese von diversen Naturstoffen essentiell beteiligt. Damit bilden sie Schlüsselenzyme in vielen Biosynthesen von Primär- und Sekundärmetaboliten in Pflanzen, Pilzen und Bakterien (Heide 2009). Diese Gruppe der aromatischen Prenyltransferasen kann man wiederum in zwei Untergruppen aufteilen (siehe Abbildung 1-15).

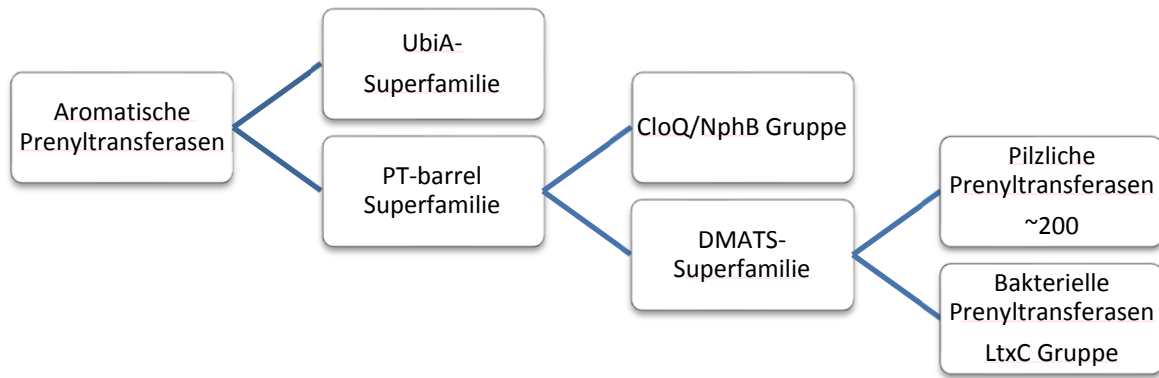


Abbildung 1-15: Einteilung der aromatischen Prenyltransferasen in verschiedene Untergruppen

Zum einen ist hierbei die UbiA-Superfamilie zu nennen, diese beinhaltet membran-gebundene Prenyltransferasen aus Bakterien, Pilzen und Pflanzen. Namensgebend für diese Gruppe ist die bakterielle, membrangebundene Prenyltransferase UbiA. Sie ist in die Biosynthese von Ubiquinon involviert und besitzt aspartatreiche Motive (NDxxD) zur Bindung der Prenyldiphosphate durch Mg^{2+} Ionen (Bräuer *et al.*, 2008). Somit ist diese Gruppe von aromatischen Prenyltransferasen membrangebunden und abhängig von divalenten Metallionen. Die zweite Untergruppe beinhaltet lösliche Prenyltransferasen aus Bakterien und Pilzen, namensgebend ist hierbei die Struktur der Prenyltransferasen. So besitzen diese alle einen sogenannten PT-barrel (Prenyltransferase-Kanal). Dieser beinhaltet fünf sich wiederholende $\alpha\beta\beta$ -Elemente. Die insgesamt zehn antiparallel angeordneten β -Faltblätter formen dabei einen zentralen β -barrel (Kanal), welcher das aktive Zentrum einschließt. Die α -Helices bilden einen angrenzenden Ring um den Kanal (Tello *et al.*, 2008) (siehe Abbildung 1-16). Die PT-barrel Superfamilie kann man nun nochmals in zwei weitere Untergruppen einteilen (siehe Abbildung 1-15). Die erste Gruppe wird nach zwei löslichen Prenyltransferasen CloQ, von *Streptomyces roseochromogenes*, und NphB, von *Streptomyces* sp. CL190, benannt. CloQ ist an der Bildung von Clorobiocin beteiligt und NphB ist in die Biosynthese des prenylierten Polyketides Naphterpin involviert. Beide weisen neben dem PT-barrel keine aspartatreichen Motive (NDxxD) wie die UbiA-Superfamilie auf. Zusätzlich zeigen alle dieser Gruppe angehörigen Prenyltransferasen, bis auf NphB, keine Abhängigkeit zu divalenten Kationen (Kumano *et al.*, 2008; Kuzuyama *et al.*, 2005; Pojer *et al.*, 2003).

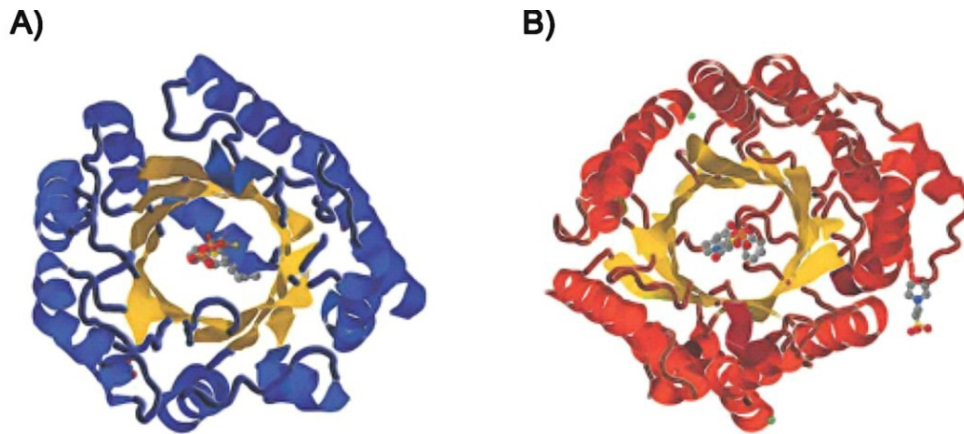


Abbildung 1-16: Dreidimensionale Strukturen von A) NphB (PDB-Nr.: 1ZB6) aus *Streptomyces sp.* (Kuzuyama *et al.*, 2005) und B) FtmPT1 (PDB-Nr.: 3O2K) aus *Aspergillus fumigatus* (Jost *et al.*, 2010). Beide Enzyme besitzen eine gemeinsame Architektur in Form eines PT-barrels.

Zu dieser CloQ/NphB Gruppe gehören insgesamt rund 17 putative Prenyltransferasen aus Bakterien und Pilzen. Elf von diesen Prenyltransferasen wurden biochemisch charakterisiert und fast alle katalysieren eine C-Prenylierung an aromatischen Substanzen wie z.B.: Phenolen oder Phenazinen (Bonitz *et al.*, 2011). Erst vor kurzem wurden zwei Prenyltransferasen dieser Gruppe charakterisiert, welche ihre Substrate am N-Atom farnelysieren, hierbei handelt es sich um DzmP, aus der Biosynthese von Diazepinomicin aus dem Bakterium *Micromonospora sp.* RV115, und um das homologe Gen *ssrg_00986*, aus *Streptomyces griseoflavus* (Bonitz *et al.*, 2013). Die zweite Gruppe der PT-barrel Superfamilie besteht ebenfalls aus löslichen Prenyltransferasen, welche ebenso keine aspartatreichen Motive besitzen und unabhängig von divalenten Metallionen sind. Die Enzyme dieser DMATS-Superfamilie sind im Vergleich zur CloQ/NphB Gruppe deutlich größer (459 vs. 307 Aminosäuren) und weisen bis auf den PT-barrel keine Sequenzähnlichkeiten zu dieser Gruppe auf (Bonitz *et al.*, 2011). Zu dieser DMATS-Superfamilie gehören die bakteriellen Prenyltransferasen auch LtxC-Gruppe genannt (Winkelblech & Li 2014). Die namensgebende Prenyltransferase dieser Gruppe stammt aus einem Cyanobakterium, die meisten anderen jedoch aus der Ordnung der Actinomycetales (Bonitz *et al.*, 2011). Wobei LtxC den Transfer einer Geranyl-Einheit an Indolactam V katalysiert. Als Endprodukt der Biosynthese entsteht Lyngbatoxin A (Edwards & Gerwick 2004). Neben den bakteriellen Prenyltransferasen gehören auch pilzliche Prenyltransferasen zur DMATS-Superfamilie, so ist DMATS (Dimethylallyltryptophansynthase) in dieser Gruppe der namensgebende Prototyp. Prenyltransferasen dieser Gruppe sind an zahlreichen Biosynthesen von diversen Sekundärmetaboliten aus Pilzen beteiligt. Da in dieser Arbeit mit Prenyltransferasen aus

dieser DMATS-Superfamilie gearbeitet wurde, wird diese Familie im Folgenden genauer beschrieben.

1.4.2. Die DMATS-Superfamilie

Durch bioinformatische Analysen im Jahr 2011 konnten dieser Familie der Prenyltransferasen rund 200 pilzliche und ca. 19 bakterielle Prenyltransferasen zugeordnet werden (Bonitz *et al.*, 2011). Sie katalysieren normalerweise einen regiospezifischen Transfer von Prenyl-Einheiten zu einen der sieben Positionen am Indolgrundgerüst. Diese Prenylierungen können revers oder regulär stattfinden (siehe Abbildung 1-17). Des Weiteren besitzen diese Prenyltransferasen eine breite Substratspezifität, so werden oft neben den natürlichen Substraten auch andere Substanzen

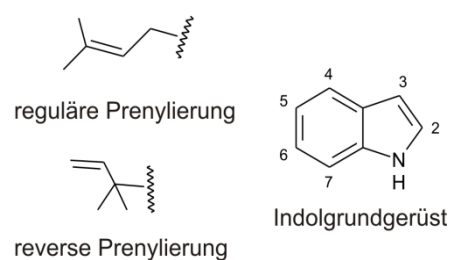


Abbildung 1-17: Prenylierungspositionen am Indolgrundgerüst

mit ähnlichem Grundgerüst oder aber auch ganz anderen Grundgerüsten als Substrate akzeptiert. Hierbei sind unter anderem 5-DMATS und FgaPT2 zu nennen, diese prenylieren neben ihren natürlichen Substraten auch Indolcarbazole (Yu *et al.*, 2012a). Die natürlichen Substrate der UbiA-Superfamilie, die Flavonoide, werden auch von 7-DMATS akzeptiert und gleich mehrere Prenyltransferasen akzeptieren neben ihren natürlichen Substraten auch Hydroxynaphthalene, die wiederum die natürlichen Substrate der CloQ/NphB Gruppe darstellen (Yu *et al.*, 2011; Yu & Li 2011). Grundsätzlich kann man die DMATS-Superfamilie aber zunächst in zwei Gruppen von Enzymen unterteilen: diejenigen, welche Indolderivate als natürliche Substrate akzeptieren und jene, deren natürliche Substrate keine Indolderivate darstellen. So prenylieren z.B. FgaPT2, MAPT, 5-DMATS, IptA, 7-DMATS und CymD einfache Indolderivate an den Positionen C-4 bis C-7 und an Position N-1 am Indolgrundgerüst (Ding *et al.*, 2008; Kremer *et al.*, 2007; Schultz *et al.*, 2010; Takahashi *et al.*, 2010; Unsöld & Li 2005; Yu *et al.*, 2012b). Zyklische Dipeptide werden ebenfalls von FgaPT2 aber auch von FtmPT1, BrePT, NotF, CdpC2PT, AnaPT, CdpNPT und CdpC3PT an den Positionen C-2, C-3 oder C-4 prenyliert (Ding *et al.*, 2010; Grundmann & Li 2005; Mundt & Li 2013; Steffan & Li 2009; Yin *et al.*, 2013; Yin *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2009b; Yin *et al.*, 2010b). Eine Zusammenfassung bzw. ein Überblick einiger Prenyltransferasen dieser Gruppe mit ihren Substraten und Prenylierungspositionen ist in folgender Tabelle 1-1 dargestellt.

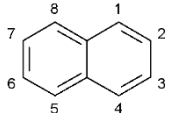
Tabelle 1-1: Indolprenyltransferasen der DMATS-Superfamilie deren natürliche Substrate Indolderivate oder zyklische Dipeptide darstellen

| Name | Organismus | Substrate | Prenyl-Donor | Position | Referenz |
|-----------------------|----------------------------|--------------------------------|--------------|-----------------------|----------------------------------|
| FgaPT2 | <i>A. fumigatus</i> | Indolderivate | DMAPP | C-4 | (Unsöld & Li 2005) |
| | | zyklische Dipeptide | DMAPP | C-4 | (Steffan & Li 2009) |
| | | Indolcarbazole | DMAPP | C-3 | (Yu <i>et al.</i> , 2012a) |
| | | Hydroxynaphthalene | DMAPP | ^a | (Yu <i>et al.</i> , 2011) |
| MAPT | <i>M. aurantiaca</i> | Indolderivate | DMAPP | C-4 | (Ding <i>et al.</i> , 2008) |
| 5-DMATS | <i>A. clavatus</i> | Indolderivate | DMAPP | C-5 | (Yu <i>et al.</i> , 2012b) |
| | | Indolcarbazole | DMAPP | C-3, C-9 | (Yu <i>et al.</i> , 2012a) |
| IptA | <i>Streptomyces</i> sp. | Indolderivate | DMAPP | C-6 | (Takahashi <i>et al.</i> , 2010) |
| 6-DMATS _{sa} | <i>S. ambofaciens</i> | Indolderivate | DMAPP | C-6 | (Winkelblech & Li 2014) |
| | | | GPP | C-6 | (Winkelblech & Li 2014) |
| | | Hydroxynaphthalene | DMAPP | C-6 ^c | (Winkelblech & Li 2014) |
| 6-DMATS _{sv} | <i>S. violaceusniger</i> | Indolderivate | DMAPP | C-6 | (Winkelblech & Li 2014) |
| | | | GPP | C-6 | (Winkelblech & Li 2014) |
| | | Hydroxynaphthalene | DMAPP | C-6 ^c | (Winkelblech & Li 2014) |
| 7-DMATS | <i>A. fumigatus</i> | Indolderivate | DMAPP | C-7 | (Kremer <i>et al.</i> , 2007) |
| CymD | <i>S. aremicola</i> | Indolderivate | DMAPP | N-1 | (Schultz <i>et al.</i> , 2010) |
| FtmPT1 | <i>A. fumigatus</i> | zyklische Dipeptide | DMAPP | C-2 | (Grundmann & Li 2005) |
| | | Tryptophan Derivate | DMAPP | N-1 | (Zou <i>et al.</i> , 2009) |
| | | Hydroxynaphthalene | DMAPP | ^a | (Yu <i>et al.</i> , 2011) |
| BrePT | <i>A. versicolor</i> | zyklische Dipeptide | DMAPP | C-2 | (Yin <i>et al.</i> , 2013) |
| NotF | <i>Aspergillus</i> sp. | cyclo-L-Trp-L-Pro | DMAPP | C-2 | (Ding <i>et al.</i> , 2010) |
| CdpC2PT | <i>N. fischeri</i> | zyklische Dipeptide | DMAPP | C-2 | (Mundt & Li 2013) |
| AnaPT | <i>N. fischeri</i> | zyklische Dipeptide | DMAPP | C-3 | (Yin <i>et al.</i> , 2009b) |
| | | zyklische Dipeptide | GPP | C-6, C-7 | (Pockrandt & Li 2013) |
| | | Hydroxynaphthalene | DMAPP | ^b | (Yu <i>et al.</i> , 2011) |
| CdpNPT | <i>A. fumigatus</i> | zyklische Dipeptide | DMAPP | C-3 | (Yin <i>et al.</i> , 2007) |
| | | Hydroxynaphthalene | DMAPP | ^b | (Yu <i>et al.</i> , 2011) |
| CTrpPT | <i>A. oryzae</i> | zyklische Dipeptide | DMAPP | C7, N-1 | (Zou <i>et al.</i> , 2010) |
| | | Hydroxynaphthalene | DMAPP | ^a | (Yu <i>et al.</i> , 2011) |
| CdpC3PT | <i>N. fischeri</i> | zyklische Dipeptide | DMAPP | C-3 | (Yin <i>et al.</i> , 2010b) |
| | | Hydroxynaphthalene | DMAPP | C-2, C-4 ^c | (Yu <i>et al.</i> , 2011) |
| CpaD | <i>Aspergillus</i> sp. | cyclo-acetoacetyl-L-tryptophan | DMAPP | C-4 | (Liu & Walsh 2009) |
| AstPT | <i>Aspergillus terreus</i> | Bisindolylbenzoquinone | DMAPP | NH + C-2 | (Tarcz <i>et al.</i> , 2014) |

^a nicht aufgeklärt^b Diese Enzyme prenylieren verschiedene Hydroxynaphthalene an vielen unterschiedlichen Positionen^c siehe Tabelle 1-2 zur Zuordnung der Prenylierungspositionen

Zusätzlich zu der bereits erwähnten breiten Substratspezifität können einige Prenyltransferasen der DMATS-Superfamilie neben DMAPP auch andere Prenyl-Einheiten übertragen. So überträgt z.B. AnaPT neben Dimethylallyl auch eine Geranyl-Einheit (C10) auf verschiedene zyklische Dipeptide und, wie erst kürzlich gezeigt werden konnte, übertragen die beiden Prenyltransferasen 6-DMATS_{So} und 6-DMATS_{SV} aus *Streptomyces ambofaciens* bzw. *violaceusniger* neben DMAPP auch GPP (C-10) auf verschiedene Indolderivate (Pockrandt & Li 2013; Winkelblech & Li 2014). Zur zweiten Gruppe der DMATS-Superfamilie gehören Prenyltransferasen, deren natürliche Substrate keine Indolderivate darstellen, z.B. akzeptiert XptB aus *A. nidulans* 1,7-Dihydroxy-6-methyl-8-hydroxymethyl-xanthon und SirD aus *Leptosphaeria maculans* prenyliert L-Tyrosin an der Hydroxylgruppe (Kremer & Li 2010; Pockrandt *et al.*, 2012). SirD hat jedoch die typische Eigenschaft eines breiten Substratspektrums der DMATS-Superfamilie, so akzeptiert SirD neben Tyrosinderivaten auch Tryptophanderivate und Phenylalaninderivate (Kremer & Li 2010; Zou *et al.*, 2011). Auch die Prenyltransferase BAE61387 aus *A. oryzae*, welche Hydroxynaphthalene als Substrate akzeptiert, gehört zur DMATS-Superfamilie. Eine Besonderheit dieser Prenyltransferase ist, dass sie zusätzlich zu DMAPP und GPP auch FPP als Prenyl-Donor akzeptiert (Pockrandt *et al.*, 2014). Ein Überblick ist in folgender Tabelle 1-2 aufgelistet.

Tabelle 1-2: Prenyltransferasen der DMATS-Superfamilie deren natürliche Substrate keine Indolderivate oder zyklische Dipeptide darstellen

| Name | Organismus | Substrate | Prenyl-Donor | Position | Referenz |
|-------|--------------------------------|---|--------------|----------|----------------------------------|
| XptB | <i>Aspergillus nidulans</i> | Xanthone | DMAPP | OH | (Pockrandt <i>et al.</i> , 2012) |
| VrtC | <i>Penicillium aethiopicum</i> | Naphthacendione | GPP | C-6 | (Chooi <i>et al.</i> , 2012) |
| SirD | <i>Leptosphaeria maculans</i> | L-Tyrosine | DMAPP | OH | (Kremer & Li 2010) |
| | | Tryptophanderivate | DMAPP | N-1, C-7 | (Kremer & Li 2010) |
| | | Tyrosinderivate | DMAPP | OH | (Zou <i>et al.</i> , 2011) |
| | | Phenylalaninderivate | DMAPP | NH (C-4) | (Zou <i>et al.</i> , 2011) |
| PAPT | <i>Phomopsis amygdali</i> | Fusicoccin P | DMAPP | OH | (Noike <i>et al.</i> , 2012) |
| BAE61 | <i>A. oryzae</i> | Hydroxynaphthalene | DMAPP | C-3, C-4 | (Pockrandt <i>et al.</i> , 2014) |
| 387 | |  | GPP | C-3, C-4 | (Pockrandt <i>et al.</i> , 2014) |
| | | Naphtalengrundgerüst | FPP | C-3, C-4 | (Pockrandt <i>et al.</i> , 2014) |

Da in dieser Arbeit die C-2, C-3 bzw. N-1 Prenylierungen an tryptophanhaltigen zyklischen Dipeptiden von Bedeutung sind, wird im Folgenden genauer auf diese eingegangen. So konnten bisher vier Prenyltransferasen der DMATS-Superfamilie, welche tryptophanhaltige zyklische Dipeptide an Position C-2 des Indolgrundgerüsts prenylieren, identifiziert werden. Dazu gehört BrePT aus *A. versicolor*, hier handelt es sich um ein orthologes Gen von *notF* aus *Aspergillus* sp. MF297-2 (Yin *et al.*, 2013). Neben BrePT wurde auch CdpC2PT aus *N. fischeri* als reverse C2-Prenyltransferase identifiziert und charakterisiert (Mundt & Li 2013). Für eine reguläre C2-Prenylierung kann man FtmPT1 aus *A. fumigatus* heranziehen (siehe Abbildung 1-18) (Grundmann & Li 2005). Alle drei von uns identifizierten Enzyme zeigen wieder eine breite Substratspezifität gegenüber zyklischen Dipeptiden auf und eignen sich daher zur Herstellung verschiedener Substanzen durch chemoenzymatische Synthese.

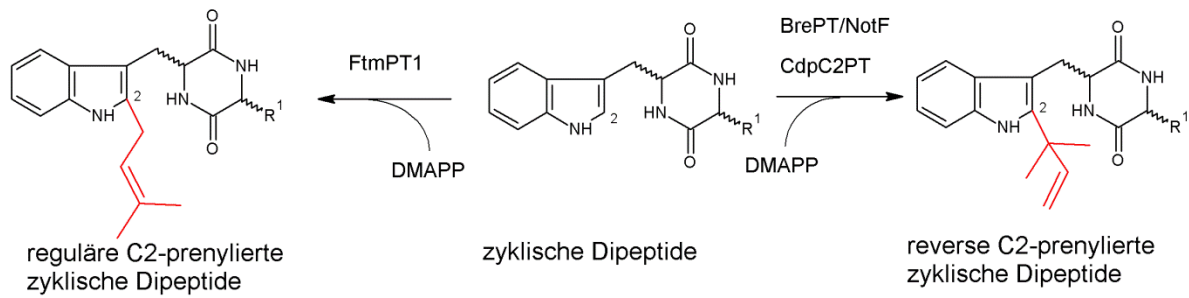


Abbildung 1-18: Reguläre und reverse C2-Prenylierungen durch die Prenyltransferasen FtmPT1 und BrePT/NotF bzw. CdpC2PT

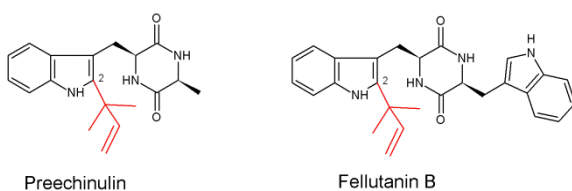


Abbildung 1-19: Reverse C2-prenylierte Naturstoffe

Reguläre und reverse C2-prenylierte Substanzen sind auch in der Natur weit verbreitet, so wurde der reverse C2-prenylierte Naturstoff Preechinulin erstmals 2009 aus *Eurotium species* isoliert und das C2-prenylierte *cyclo*-L-Trp-L-Trp, Fellutanin B wurde im Jahr 2000 aus *Penicillium fellutanum* isoliert (Kozlovsky *et al.*, 2000; Slack *et al.*, 2009) (siehe Abbildung 1-19). Ein regulär C2-prenylierter Naturstoff ist das prenylierte *cyclo*-L-Trp-L-Pro, Tryprostatin B. Diese Substanz wurde 1995 erstmals aus *A. fumigatus* isoliert (Cui *et al.*, 1995) (siehe Abbildung 1-20). Ein weiterer gleich zweifach regulär C2-prenylierter Naturstoff ist Asterequinon CT5. Dieser wurde 1996 erstmals aus *A. terreus* isoliert (Mocek *et al.*, 1996) (siehe Abbildung 1-20).

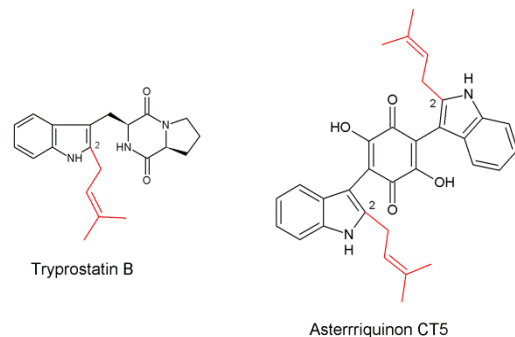


Abbildung 1-20: Reguläre C2-prenylierte Naturstoffe

Neben diesen vier Prenyltransferasen konnten auch drei Prenyltransferasen aus der DMATS-Superfamilie charakterisiert werden, welche zykische Dipeptide an Position C-3 prenylieren (siehe Tabelle 1-1). Als erstes ist CdpC3PT aus *N. fischeri* zu nennen, deren natürliches Substrat bisher nicht bekannt ist. Sie prenyliert verschiedene tryptophanhaltige zykische Dipeptide unter Bildung eines Pyrrolo[2,3- β]indols mit β -konfigurierter reverser C3-Dimethylallyl-Einheit (siehe Abbildung 1-21) (Yin *et al.*, 2010b). Auch CdpNPT aus *A. fumigatus* katalysiert eine reverse C3-Prenylierung in β -Position unter Bildung eines Pyrrolo[2,3- β]indols (Yin *et al.*, 2007). Bei der dritten Prenyltransferase handelt es sich um

AnaPT, deren natürliches Substrat (R)-Benzodiazepinedion in der Biosynthese von Acetylaszonalenin darstellt (siehe 1.3.1.). Hier findet ebenfalls eine reverse C3-Prenylierung statt, allerdings in α -Position, so dass Pyrrolo[2,3- α]Indole entstehen (siehe Abbildung 1-21) (Yin *et al.*, 2009b).

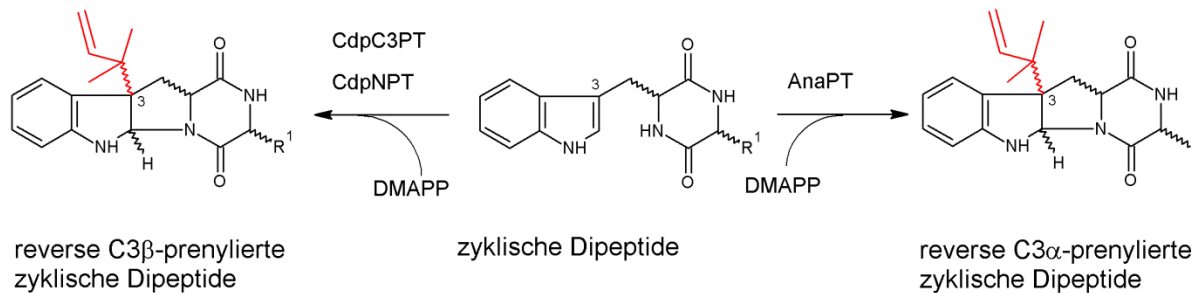


Abbildung 1-21: Reverse C3 α - und C3 β -Prenylierungen durch die Prenyltransferasen AnaPT und CdpC3PT bzw. CdpNPT

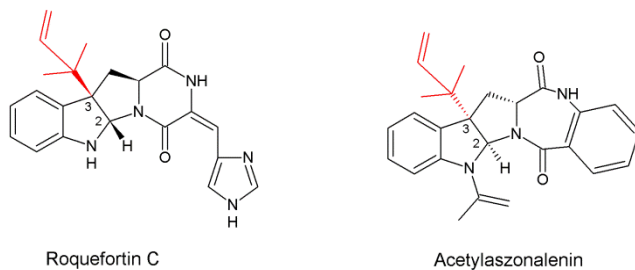


Abbildung 1-22: Reverse C3-prenylierte Naturstoffe

Acetylaszonalenin und Roquefortin C (siehe Abbildung 1-22). Als regulär C3-prenylierter Naturstoff konnte bisher lediglich Nocardioazine B, welches 2011 aus dem Bakterium *Nocardioopsis* sp. (CMB-M1232) isoliert wurde, identifiziert werden (Raju *et al.*, 2011) (siehe Abbildung 1-23).

Bisher wurde keine Prenyltransferase identifiziert, welche eine reguläre C3-Prenylierung tryptophanhaltiger Diketopiperazine katalysiert. Auch aus der Natur konnten bisher hauptsächlich reverse C3-prenylierte Naturstoffe isoliert und identifiziert werden z.B.

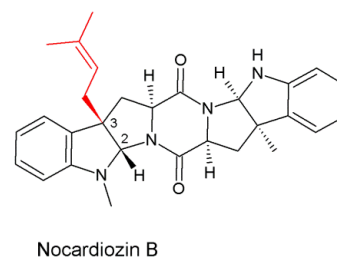


Abbildung 1-23: Regulär C3-prenylierter Naturstoff

Wie aus Tabelle 1-1. zu entnehmen ist, wurde bisher nur eine Prenyltransferase identifiziert, welche eine reverse N1-Prenylierung von *cyclo*-L-Trp-L-Trp und *cyclo*-L-Trp-L-Phe ermöglicht. Hierbei handelt es sich um eine Prenyltransferase mit hoher Substrat Spezifität: cTrpPT (siehe Abbildung 1-24) (Zou *et al.*, 2010).

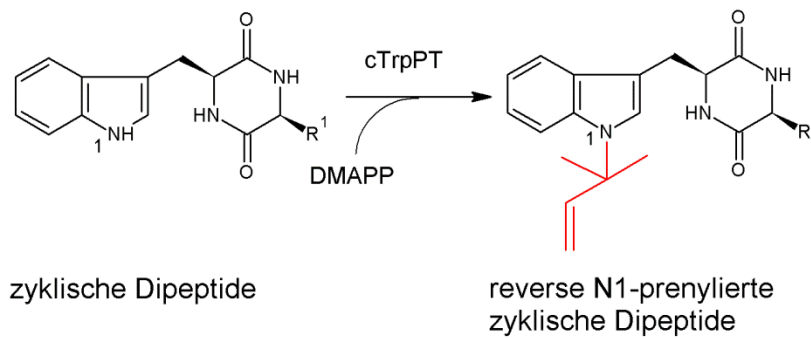
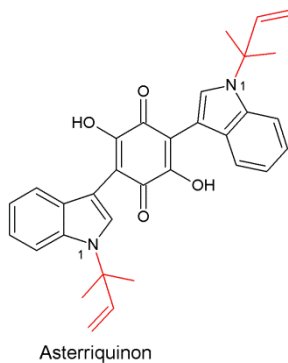


Abbildung 1-24: Reverse N1-Prenylierung durch die Prenyltransferasen cTrpPT



Auch in der Natur findet man reverse N1-prenylierte Naturstoffe, z.B. Asterriquinon (siehe Abbildung 1-25). Dieser wurde bereits 1976 aus *A. terreus* isoliert und als Antitumor aktiver Naturstoff beschrieben (Yamamoto *et al.*, 1976a; Yamamoto *et al.*, 1976b). Ein regulär N1-prenylierter Naturstoff ist z.B. Fumitremorgin B (siehe Abbildung 1-26). Diese und auch andere Prenyltransferasen aus Tabelle 1-1 sind meistens in bekannte und bisher unbekannte

Abbildung 1-25: Revers N1-prenylierter Naturstoff

Biosynthesewege von verschiedenen Naturstoffen involviert. Meist schließt sich der Prenylierungsschritt der Kondensation von zwei

Substanzen an, welche durch eine NRPS oder NRPS-like Synthese katalysiert wird (siehe 1.3.3). Bei den Endprodukten der Biosynthese handelt es sich vorwiegend um zytotoxische Naturstoffe. Die Prenylierungsreaktion spielt dabei eine entscheidende Rolle, da mit der Prenylierung meist eine zytotoxische Wirkung, wie für Asterriquinon bereits erwähnt, einhergeht.

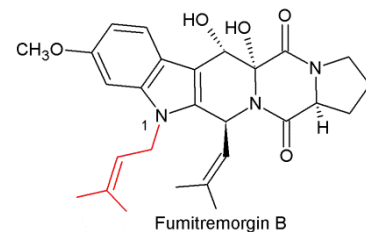


Abbildung 1-26: Regulär N1-prenylierter Naturstoff

1.5. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Chemoenzymatische Synthese verschiedener Tryprostatin B-Analoga durch die Prenyltransferase FtmPt1 mit anschließenden Untersuchungen zur Zytotoxizität

- Überproduktion von FtmPT1 in *E. coli*-Zellen
- Synthese von *cyclo*-D-Trp-L-Pro und *cyclo*-D-Trp-D-Pro
 - Bestätigung der Stereochemie mittels ^1H -NMR-Spektroskopie und CD-Messungen
- Bestimmung der Zytotoxizität der prenylierten tryptophanhaltigen Diketopiperazine gegenüber den unprenylierten Substraten mittels Zytotoxizitätstest (MTT-Test)
- Analyse des Einflusses der Stereochemie der prenylierten Produkte auf deren Zytotoxizität

Isolierung von Fumigaclavin A aus *P. commune* NRRL2033

- Kultivierung von *P. commune* NRRL2033 auf verschiedenen Medien
- Isolierung von Fumigaclavin A und Bestimmung der Stereochemie mittels NOESY-Spektroskopie

Isolierung von Naturstoffen aus *N. fischeri* NRRL181

- Kultivierung von *N. fischeri* NRRL181 auf verschiedenen Medien unter unterschiedlichen Bedingungen (Temperatur, rpm, Emers- und Submerskulturen)
- Isolierung von Fumitremorgin A und Aufklärung des letzten Biosyntheseschrittes von Fumitremorgin A
- Isolierung weiterer Naturstoffe und Strukturaufklärung mittels ESI-MS- und NMR-Spektroskopie

Untersuchungen zur Biosynthese der isolierten Naturstoffe aus *N. fischeri* NRRL181

- Amplifikation von potenziellen Genen für die Biosynthese der isolierten Naturstoffe aus cDNA bzw. gDNA von *N. fischeri* NRRL181
- Klonierung der Gene in Expressionsvektoren (pQE60, pQE70, pHis8, pYES2/NT C) mit anschließender Expression der Gene in *E. coli* bzw. *S. cerevisiae* und Aufreinigung der überproduzierten Proteine
- Durchführung verschiedener Enzymassays mit möglichen Substraten und Kofaktoren

In vivo Produktion von Deoxybrevianamid E in *A. nidulans* TN02A7

- Herstellung eines auf pQE60 bzw. pCaW34 basierenden Konstruktes mit konstitutivem Promotor, dem Prenyltransferasegen *brePT* aus *A. versicolor*, einem Terminator sowie einem Selektionsmarker.
- Transformation mittels Protoplastierung in *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*)
- Identifikation von Transformanten mittels PCR-Screening
- Kultivierung der Transformanten unter verschiedenen Bedingungen (Temperatur, Medien)
- Isolierung von Deoxybrevianamid E mittels semipräparativer HPLC aus dem Kulturfiltrat eines Transformaten

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien, Säulenmaterialien, Enzyme und Kits

2.1.1. Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden vorwiegend von den Firmen Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Bestandteile zur Herstellung von Kulturmedien wurden hauptsächlich von den Firmen BD (Heidelberg) und Applichem (Darmstadt) verwendet. DMAPP, *cyclo*-L-Trp-L-Pro, *cyclo*-L-Trp-D-Pro sowie *cyclo*-L-Trp-L-Ala, *cyclo*-L-Trp-D-Ala, *cyclo*-D-Trp-D-Ala und *cyclo*-D-Trp-L-Ala wurde freundlicherweise von Frau Lena Ludwig (AK Li) synthetisiert und zur Verfügung gestellt. *Cyclo*-L-Trp-L-His wurde freundlicherweise von Frau Dr. Xia Yu (AK Li) zur Verfügung gestellt. Die als Referenz dienenden Substanzen Fumitremorgin C, 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C, Fumitremorgin B, Verruculogen und Fumitremorgin A, wurden freundlicherweise von Prof. Qianqun Gu (Qingdao, China) und Prof. Kuznetsova (Wladiwostok, Russland) zur Verfügung gestellt. Die speziellen Chemikalien und Medienbestandteile sind in Tabelle 2-1 dargestellt.

Tabelle 2-1: Chemikalien und Medienbestandteile

| Chemikalien | Hersteller |
|---|-------------------------------|
| 1,4-Dithiothreitol (DTT) | Roth, Karlsruhe |
| 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactosid (X-Gal) | Fermentas, Burlington, Canada |
| Acetonitril, HPLC | Roth, Karlsruhe |
| Adenin | Roth, Karlsruhe |
| Agar-Agar | BD, Heidelberg |
| Agarose | GE Healthcare, München |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Bromphenolblau | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Carbenicillin | Roth, Karlsruhe |
| Chloramphenicol | Roth, Karlsruhe |
| Coomassie Brilliant Blau R-250 | Roth, Karlsruhe |
| <i>cyclo</i> -D-Trp-L-Tyr | Bachem, Weil am Rhein |
| <i>cyclo</i> -L-Trp-Gly | Bachem, Weil am Rhein |
| <i>cyclo</i> -L-Trp-L-Leu | Bachem, Weil am Rhein |
| <i>cyclo</i> -L-Trp-L-Phe | Bachem, Weil am Rhein |
| <i>cyclo</i> -L-Trp-L-Trp | Bachem, Weil am Rhein |
| <i>cyclo</i> -L-Trp-L-Tyr | Bachem, Weil am Rhein |
| D-(+)-Raffinose | Roth, Karlsruhe |
| D-Glucose | Caelo, Bonn |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| dNTP Mix | Bioline GmbH, Luckenwalde |
| D-Sorbitol | Roth, Karlsruhe |
| EDTA | Merck, Darmstadt |
| Ethylacetat | Fisher Scientific, Schwerte |

| | |
|---|--------------------------------------|
| Ethylacetat p.A. | Acros, Geel, Belgien |
| Galaktose | Fluka, Taufkirchen |
| H-D-Pro-O-Me-HCl | Bachem, Weil am Rhein |
| Hefeextrakt | BD, Heidelberg; Applichem, Darmstadt |
| Imidazol | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Isopropyl- β -thiogalactosid (IPTG) | Roth, Karlsruhe |
| Kanamycin | Roth, Karlsruhe |
| L-Arginin | Roth, Karlsruhe |
| L-Asparaginsäure | Roth, Karlsruhe |
| L-Cystein | Roth, Karlsruhe |
| L-Histidin | Roth, Karlsruhe |
| L-Isoleucin | Merck, Darmstadt |
| L-Leucin | Merck, Darmstadt |
| L-Lysin | Roth, Karlsruhe |
| L-Methionin | Merck, Darmstadt |
| L-Phenylalanin | Roth, Karlsruhe |
| L-Prolin | Roth, Karlsruhe |
| L-Serin | Merck, Darmstadt |
| L-Threonin | Merck, Darmstadt |
| L-Tryptophan | Roth, Karlsruhe |
| L-Tyrosin | Roth, Karlsruhe |
| L-Valin | Roth, Karlsruhe |
| Methanol | Fisher Scientific, Schwerte |
| Methanol, HPLC | Roth, Karlsruhe |
| N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) | Roth, Karlsruhe |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Roth, Karlsruhe |
| Natriumsulfat | VWR international, Darmstadt |
| N-Boc-D-Pro-OH | Bachem, Weil am Rhein |
| Pepton | BD, Heidelberg |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) | Roth, Karlsruhe |
| Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween® 20) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Rinderserumalbumin (BSA) | Merck, Darmstadt |
| Roti® Phenol/Chloroform (pH 8,0) | Roth, Karlsruhe |
| Rotiphorese®Gel 30 (30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid) | Roth, Karlsruhe |
| Tetracyclin | Roth, Karlsruhe |
| Trifluoressigsäure | Roth, Karlsruhe |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Trypton BD | Applichem, Darmstadt |
| Yeast nitrogen base without amino acids | BD, Heidelberg |
| β -Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |

2.1.2. Säulenmaterialien

Die Säulenmaterialien wurden als Trockensubstanzen, Suspension oder Fertigsäulen vom Hersteller bezogen. Die Lagerung der Materialien erfolgte nach Herstelleranweisung.

Tabelle 2-2: Materialien für die Chromatographie

| Säulenmaterial | Hersteller |
|---|------------------------------------|
| Kieselgel 60 (0,063 - 0,2 mm) | Roth, Karlsruhe |
| MultioHigh 100 Si (Fertigsäule, 5 µm, 250 x 4 mm) | C&S Chromatographie Service, Düren |
| Multospher 120 RP 18-5 (Fertigsäule, 5 µm, 250 x 10 mm) | C&S Chromatographie Service, Düren |
| Multospher 120 RP 18-5 (Fertigsäule, 5 µm, 250 x 4 mm) | C&S Chromatographie Service, Düren |
| Ni-NTA-Agarose | Qiagen, Hilden |

2.1.3. Enzyme, Kits und Antikörper

Tabelle 2-3: Enzyme, Größenstandards, Antikörper und Kits

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|---------------------------------|
| Anti-Maus-IgG Alkaline Phosphatase | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| E.Z.N.A.™ Fungal RNA Minipräp Kit | Omega Bio-Tek, Norcross, GA |
| Expand™ High Fidelity Plus PCR System | Roche Applied Science, Mannheim |
| GeneRuler DNA Ladder Mix | Fermentas, St. Leon-Roth |
| HighYield PCR Clean-up and Gel-Extraction Kit | SLG Südlabor, Gauting |
| Kälberserum | PAN Biotech, Regensburg |
| Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis | GE Healthcare, Freiburg |
| Lysozym (76000 U/mg) | Fluka, Ulm |
| Lysozym von <i>Trichoderma harzianum</i> | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Monoklonaler Maus Anti-His-tag Antikörper | Calbiochem, Darmstadt |
| NucleoSpin® Plasmid | Macherey-Nagel, Düren |
| pGEM® -T easy Vector system I | Promega, Mannheim |

| | |
|---|-------------------------|
| Precision Plus Protein TM Standards | Bio-Rad, München |
| ProtoScript [®] M-MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit | BioLabs (New England) |
| Restriktionsendonukleasen | Jena BioScience, Jena |
| RNAse A | Roth, Karlsruhe |
| RPMI 1640 | PAN Biotech, Regensburg |
| S.c. EasyComp TM Transformation Kit | Invitrogen, Karlsruhe |
| SYBR [®] Safe DNA Gel stain | Invitrogen, Karlsruhe |
| T4-DNA Ligase | Fermentas, St. Leon-Rot |
| Wizard [®] SV Gel and PCR Clean-Up System | Promega, Mannheim |

2.2. Plasmide, Primer, Bakterien- und Pilzstämme

2.2.1. Plasmide

Tabelle 2-4: Kommerziell erworbene Klonierungs- und Expressionsvektoren

| Vektor | Beschreibung | Hersteller |
|-------------|--|----------------------------|
| pGEM-T Easy | Klonierungsvektor, der in linearer Form mit einem 3'-T-Überhang zum direkten einklonieren von PCR Produkten mit 3'-A-Überhang verwendet wurde; lacZ α , ori, f1-origin, Amp ^R | Promega, Mannheim |
| pHis8 | Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , Kan ^R , f1-Origin, pBR322-Origin, T7-Promotor, Sequenz für N-terminalen His ₈ -tag und C-terminalen His ₆ -tag | (Jez <i>et al.</i> , 2000) |
| pQE-60 | Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , T5-Promotor, ColE1, Amp ^R , Sequenz für C-terminalen His ₆ -tag | Qiagen, Hilden |
| pQE-70 | Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , T5-Promotor, ColE1, Amp ^R , Sequenz für C-terminalen His ₆ -tag | Qiagen, Hilden |
| pYES2/NT C | Expressionsvektor für <i>S. cerevisiae</i> , Amp ^R , URA3-Marker, pUC-Origin, f1-Origin, 2 μ -Origin, GAL 1-Promotor, T7-Promotor, Sequenz für N-terminalen His ₆ -tag | Invitrogen, Karlsruhe |

Tabelle 2-5: Verwendete Plasmide

| Plasmid | Beschreibung | Referenz |
|---------|--|--|
| pAG012 | Expressionskonstrukt von <i>ftmPT1</i> aus <i>A. fumigatus</i> für <i>E. coli</i> , basierend auf pQE70 | (Grundmann & Li 2005) |
| pAG016 | Expressionskonstrukt von <i>ftmP</i> aus <i>A. fumigatus</i> für <i>E. coli</i> , basierend auf pQE70 | Dissertation von Dr. Alexander Grundmann |
| pCaW34 | Konstrukt zur Expression von <i>cdpNPT</i> aus <i>A. fumigatus</i> in <i>A. nidulans</i> , basierend auf pQE60 | Carsten Wunsch (AK Li) |
| pKM32 | pGEM-T Easy Konstrukt mit <i>cdpNPT</i> und einem Teil des Terminators <i>trpC_{term}</i> | Dissertation von Dr. Kathrin Mundt |
| pMM007 | Expressionskonstrukt von <i>ftmO</i> aus <i>A. fumigatus</i> für <i>E. coli</i> , basierend auf pQE60 | Dissertation von Dr. Marco Matuschek |
| pSY1 | Expressionskonstrukt von <i>brePT</i> aus <i>A. versicolor</i> NRRL573 für <i>E. coli</i> , basierend auf pET28a | (Yin <i>et al.</i> , 2013) |

Alle im Rahmen dieser Arbeit hergestellten bzw. relevanten Klonierungs- und Expressionskonstrukte sind im Folgenden aufgeführt.

Tabelle 2-6: Plasmide, die im Rahmen dieser Arbeit entstanden

| Plasmid | Beschreibung |
|---------|--|
| pBW01 | Klonierungskonstrukt für <i>NFIA_093440</i> (NW_001509762; 6211331-6212497) aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, PCR amplifiziertes Fragment (1170 bp, Primer: <i>NFIA_093340_for</i> und <i>NFIA_093340_rev</i>) aus gDNA von <i>N. fischeri</i> NRRL181, kloniert in pGEM-T Easy (Schnittstellen: <i>SphI</i> und <i>BamHI</i>) |
| pBW05 | Klonierungskonstrukt für <i>NFIA_093380</i> (NW_001509762; 6193295-6194130) aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, PCR amplifiziertes Fragment (786 bp, Primer: <i>NFIA_093380_for</i> und <i>NFIA_093380_rev</i>) aus cDNA <i>N. fischeri</i> NRRL181, kloniert in pGEM-T Easy (Schnittstelle: <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i>) |
| pBW08 | Expressionskonstrukt für <i>NFIA_093440</i> aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, 1162 bp, <i>SphI</i> - <i>BamHI</i> -Fragment aus pBW01, kloniert in pQE70 |
| pBW09 | Expressionskonstrukt für <i>NFIA_093380</i> aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, 785 bp, <i>NcoI</i> - <i>BamHI</i> -Fragment aus pBW05, kloniert in pQE60 |
| pBW10 | Klonierungskonstrukt für <i>NFIA_093380</i> aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, PCR amplifiziertes Fragment (786 bp, Primer: <i>NFIA_093380_for1</i> und <i>NFIA_093380_rev1</i>) von pBW05 kloniert in pGEM-T Easy (Schnittstellen: <i>BamHI</i> und <i>HindIII</i>) zur Umklonierung in pHis8 |
| pBW12 | Klonierungskonstrukt für <i>NFIA_093440</i> aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, PCR amplifiziertes Fragment (1170 bp, Primer: <i>NFIA_093340_for1</i> und <i>NFIA_093340_rev1</i>) von pBW01 kloniert in pGEM-T Easy (Schnittstellen: <i>BamHI</i> und <i>HindIII</i>) zur Umklonierung in pHis8 |
| pBW13 | Klonierungskonstrukt für <i>NFIA_093440</i> aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, PCR amplifiziertes Fragment (1170 bp, Primer: <i>NFIA_093340_for1</i> und <i>NFIA_093340_rev2</i>) von pBW01 kloniert in pGEM-T Easy (Schnittstellen: <i>BamHI</i> und <i>XbaI</i>) zur Umklonierung in pYES2/NT C |
| pBW14 | Expressionskonstrukt für <i>NFIA_093440</i> aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, 1170 bp, <i>BamHI</i> - <i>HindIII</i> -Fragment aus pBW12, kloniert in pHis8 |
| pBW15 | Expressionskonstrukt für <i>NFIA_093440</i> aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, 1170 bp, <i>BamHI</i> - <i>XbaI</i> -Fragment aus pBW13, kloniert in pYES2/NT C |
| pBW20 | Klonierungskonstrukt für <i>NFIA_093390</i> (NW_001509762; 6197437-6199023) aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, PCR amplifiziertes Fragment (1586 bp, Primer: <i>NFIA_093390_for</i> und <i>NFIA_093390_rev</i>) aus gDNA von <i>N. fischeri</i> NRRL181, kloniert in pGEM-T Easy (Schnittstellen: <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i>) |
| pBW21 | Klonierungskonstrukt für <i>brePT</i> aus <i>A. versicolor</i> NRRL573, PCR amplifiziertes Fragment (1247 bp, Primer: <i>BrePT_for_3</i> und <i>BrePT_rev_3</i> von pSY1, kloniert in pGEM-T Easy (Schnittstellen: <i>NcoI</i> und <i>BglII</i>) |
| pBW22 | Expressionskonstrukt für <i>NFIA_093390</i> aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, 1586 bp, <i>NcoI</i> - <i>BamHI</i> -Fragment aus pBW20, kloniert in pQE60 |
| pBW23 | pGEM-T Easy Konstrukt aus pKM32 mit <i>brePT</i> aus <i>A. versicolor</i> NRRL573 (1270 bp, Schnittstellen: <i>NcoI</i> und <i>NcoI</i>) herausgeschnitten aus pBW21 |
| pBW24 | pQE60 Konstrukt aus pCaW34 mit <i>brePT</i> aus <i>A. versicolor</i> NRRL573 (1270 bp) herausgeschnitten aus pBW23 (Schnittstellen: <i>NcoI</i> und <i>NcoI</i>) |

2.2.2. Primer

Tabelle 2-7: Primer, die im Rahmen dieser Arbeit entstanden sind

| Primer | Sequenz (5'→3') | Schnittstellen | Plasmide |
|------------------|---|----------------|----------------|
| BrePT_for_3 | TAC [▼] CATG [▲] GATATGACGGCCCCA | NcoI | pBW21 |
| BrePT_rev_3 | A [▼] GATC [▲] TTCAATCTTCTTCCACAGATAGG TACTTTGTGAA | BglII | pBW21 |
| FtmA_fw | ATTCTAGATCACGTGATGGCGATGGCTCTTGCGGT | - | - |
| FtmA_rv2 | GCAACATTCTGTCCATTGCACCGT | - | - |
| NFIA_093380_for | C [▼] CATG [▲] GCTCCAAGTCGTGACGCCT | NcoI | pBW09 |
| NFIA_093380_for1 | G [▼] GATC [▲] CTCTCCAAGTCGTGACGCC | BamHI | pBW10 |
| NFIA_093380_rev1 | A [▼] AGCT [▲] TTCATTTTATCCCGATCTCACAAG CCTCATA | HindIII | pBW10 |
| NFIA_093380_rev2 | T [▼] CTAG [▲] ATCATTTTATCCCGATCTCACA AGCCTCATA | XbaI | - |
| NFIA_093380-rev | G [▼] GATC [▲] CTTTATCCCGATCTCACAAGCCT CATA | BamHI | pBW09 |
| NFIA_093390_for | C [▼] CATG [▲] GCAGACATAGACAGAGC | NcoI | pBW22 |
| NFIA_093390_rev | G [▼] GATC [▲] CTGACTGATTCCGGTATATC | BamHI | pBW22 |
| NFIA_093440_for | G [▼] CATG [▲] CCTCTTCTGTATTCATTGTGTC | spHI | pBW08 |
| NFIA_093440_rev | G [▼] GATC [▲] CCTGCTCCCAATCTGG | BamHI | pBW08 |
| NFIA_093440_rev2 | T [▼] CTAG [▲] ACTACTGCTCCCAATCTGGC | XbaI | pBW13 |
| NFIA_093440_for1 | G [▼] GATC [▲] CTCTCTTCTGTATTCATTGTGTC TTTT | BamHI | pBW12 pBW13 |
| NFIA_093440_rev1 | A [▼] AGCT [▲] TCTACTGCTCCCAATCTGGCCT | HindIII | pBW12 |

2.2.3. Bakterienstämme

Tabelle 2-8: Verwendete Bakterienstämme

| Stamm | Beschreibung/relevante Marker | Hersteller/Referenz |
|---------------------|--|--------------------------------|
| BL21 (DE3) pLysS | F^- <i>ompT hsdS_B(r_B-m_B-) gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cam ^R) | Invitrogen, Karlsruhe |
| ET12567 | F^- , dam-13::Tn9, dcm6 hsdM, hsdR, zjj- 202::Tn10, recF143, galK2, galT22, ara-14, lacY1, xyl15, leuB6, thi1, tonA31, rpsL136, his64, tsx78, mtl-I, glnV44 | (MacNeil <i>et al.</i> , 1992) |
| M15[pREB4] | Nal ^S Str ^S Rif ^S Thi ⁻ Lac ⁻ Ara ⁺ Gal ⁺ Mtl ⁻ F ⁻ RecA ⁺ Uvr ⁺ Lon ⁺ Km ^R | Qiagen, Hilden |
| SG13009 [pREP4] | Nal ^S , Str ^S , Rif ^S , Thi ⁻ , Lac ⁻ , Ara ⁺ , Gal ⁺ , Mtl ⁻ , F ⁻ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺ | Qiagen, Hilden |
| XL1 Blue MRF' | $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac$ [F' <i>proAB lacI^qZ</i> Δ M15 Tn10 (Tet ^r)] | Stratagene |

2.2.4. Pilzstämme

Tabelle 2-9: Verwendete Pilzstämme

| Stamm | Genotyp | Referenz/Quelle |
|---|--|-------------------------------------|
| <i>Aspergillus nidulans</i> TN02A7 | <i>pyrG89, pyroA4, nkuA::argB, riboB2</i> | Prof. Berl R. Oakley |
| <i>Aspergillus nidulans</i> CaW03 (<i>ftmPS</i>) | <i>pyroA4, nku::argB; riboB2</i> | Carsten Wunsch (AK Li) |
| <i>Neosartorya fischeri</i> NRRL181 | Wildtypstamm | ARS Culture Collection (Peoria, IL) |
| <i>Penicillium commune</i> NRRL 2033 (=VKM F-3088 bzw. ATCC10477) | Wildtypstamm | ARS Culture Collection (Peoria, IL) |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> INVSc1 | <i>His3Δ1/his3Δ1 leu2/leu2 trp1-289/trp1-289 ura3-52/ura3-52</i> | Invitrogen, Karlsruhe |

2.3. Nährmedien

Sofern nicht anders angegeben, beziehen sich die Angaben auf 1000 ml H₂O_{millipore}. Zur Sterilisation wurden die Medien 20 min bei 121 °C und 2 bar Druck autoklaviert. Zur Herstellung von Festmedien wurde vor dem Autoklavieren 2% Agar-Agar hinzugefügt. Der pH-Wert wurde sofern nicht anders angegeben, mittels HCl bzw. NaOH entsprechend eingestellt. Die Lagerung der Medien erfolgte bei 4 °C.

2.3.1. Nährmedien zur Kultivierung von Ascomyceten

Czapek Dox + 0,5% Hefeextrakt (CDH)

| | |
|-------------|------|
| Czapek Dox | 35 g |
| Hefeextrakt | 5 g |

mCDH-Medium

| | |
|--|--------|
| Saccharose | 30 g |
| Hefeextrakt | 5,1 g |
| NaNO ₃ | 2 g |
| KH ₂ PO ₄ | 1 g |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 0,3 g |
| FeSO ₄ x 7 H ₂ O | 0,01 g |

Malz Extrakt Pepton (MEP)

| | |
|-------------|------|
| Malzextrakt | 30 g |
| Pepton | 3 g |

Potato Dextrose (PD)

| | |
|----------------------|------|
| Potato Dextrose Both | 24 g |
|----------------------|------|

HA-Medium

| | |
|-------------|------|
| Hefeextrakt | 4 g |
| Malzextrakt | 10 g |
| Glucose | 4 g |
| pH = 5,5 | |

Weizen-Medium

| | |
|-----------------------|--------|
| Weizen | 100 g |
| H ₂ O | 100 ml |
| 30 min quellen lassen | |

Reis-Medium

| | |
|-----------------------|--------|
| Reis | 100 g |
| H ₂ O | 100 ml |
| 30 min quellen lassen | |

2.3.2. Nährmedien zur Protoplastierung von *A. nidulans* CaW03 (ftmPS)**Nitratsalze**

| | |
|--|--------|
| NaNO ₃ | 120 g |
| KCl | 10,4 g |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 10,4 g |
| KH ₂ PO ₄ | 30,4 g |

Spurenelemente

| | |
|--|--------|
| ZnSO ₄ x 7 H ₂ O | 2,2 g |
| H ₃ BO ₃ | 1,1 g |
| MnCl ₂ x 4 H ₂ O | 0,5 g |
| FeSO ₄ x 7 H ₂ O | 0,5 g |
| CoCl ₂ x 6 H ₂ O | 0,16 g |
| CuSO ₄ x 5 H ₂ O | 0,16 g |
| (NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O | 0,11 g |
| EDTA | 5 g |

Der pH-Wert wurde mit KOH auf 6,5 eingestellt und die Lösung wurde unter Rühren bis zu einem lila Farbumschlag bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurde die Lösung steril filtriert und bei 4 °C aufbewahrt.

GMM Medium

| | |
|---------|-------|
| L1 | 50 ml |
| Glucose | 10 g |

Dem Medium wurden entsprechende auxotrophe Marker zugegeben.

Für NRPS Transformanten

| | |
|------------|--------|
| Riboflavin | 2,5 mg |
| Arginin | 0,5 g |
| Pyridoxin | 0,5 g |

Für NRPS+PT Transformanten

| | |
|------------|--------|
| Riboflavin | 2,5 mg |
| Arginin | 0,5 g |

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 6,5 eingestellt und nach dem Autoklavieren wurde dem Medium 1 ml Spurenelementlösung zugegeben.

AMM Medium

| | |
|--|--------|
| NaNO ₃ | 6 g |
| Glucose | 10 g |
| CaCl ₂ | 0,52 g |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 0,52 g |
| KH ₂ PO ₄ | 1,52 g |

Dem Medium wurden ebenfalls die entsprechenden auxotrophen Marker wie beim GMM-Medium beschrieben zugegeben. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 6,5 eingestellt und nach dem Autoklavieren wurde dem Medium 1 ml Spurenelementlösung zugegeben.

Bottom-Agar

| | |
|----------|-------|
| L1 | 50 ml |
| Glucose | 10 g |
| Sorbitol | 219 g |

Dem Medium wurden ebenfalls die entsprechenden auxotrophen Marker wie beim GMM-Medium beschrieben zugegeben. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 6,5 eingestellt und nach dem Autoklavieren wurde dem Medium 1 ml Spurenelementlösung zugegeben.

Top-Agar

| | |
|----------|--------|
| L1 | 50 ml |
| Glucose | 10 g |
| Sorbitol | 220 g |
| Agar | 0,75 % |

Dem Medium wurden ebenfalls die entsprechenden auxotrophen Marker wie beim GMM-Medium beschrieben zugegeben. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 6,5 eingestellt und nach dem Autoklavieren wurde dem Medium 1 ml Spurenelementlösung zugegeben.

2.3.3. Nährmedien zur Kultivierung von *E. coli***LB Medium**

| | |
|-------------|------|
| NaCl | 10 g |
| Trypton | 10 g |
| Hefeextrakt | 5 g |
| pH = 7 | |

SOC Medium

| | |
|-------------------|--------|
| Trypton | 20 g |
| Hefeextrakt | 5 g |
| NaCl | 10 mM |
| KCl | 2,5 mM |
| MgCl ₂ | 10 mM |

Nach dem Autoklavieren wurden 20 ml 1M Glucose zugeben.

2.3.4. Nährmedien zur Kultivierung von *S. cerevisiae***Yeast Extract Peptone Dextrose Medium (YPD-Medium) (Ausubel *et al.*, 1996)**

| | |
|---|------|
| Pepton | 10 g |
| Hefeextrakt | 5 g |
| ad 450 ml H ₂ O _{millipore} | |

Nach dem Autoklavieren wurden 50 ml einer steril filtrierten 20%igen Glucose Lösung zugeben.

Minimal Medium ohne Uracil (SCU-Medium) (nach Herstellerangaben von pYES2/NT C)

| | |
|---------------------|--------|
| Yeast Nitrogen Base | 0,67g |
| L-Adenin | 0,01g |
| L-Arginin | 0,01g |
| L-Cystein | 0,01g |
| L-Leucin | 0,01g |
| L-Lysin | 0,01g |
| L-Threonin | 0,01g |
| L-Tryptophan | 0,01g |
| L-Asparaginsäure | 0,005g |
| L-Histidin | 0,005g |
| L-Isoleucin | 0,005g |
| L-Methionin | 0,005g |
| L-Phenylalanin | 0,005g |
| L-Prolin | 0,005g |
| L-Serin | 0,005g |
| L-Tyrosin | 0,005g |
| L-Valin | 0,005g |

Ad H₂O_{millipore} 800 ml

SCU Festmedium

| | |
|------------|--------|
| SCU-Medium | 400 ml |
| Sorbitol | 91 g |
| Agar | 2% |

Nach dem Autoklavieren wurden 50 ml einer steril filtrierten 20%igen Glucose Lösung und 50 ml autoklaviertes H₂O_{millipore} zugeben.

SCU Wachstumsmedium

| | |
|------------|--------|
| SCU-Medium | 400 ml |
|------------|--------|

Nach dem Autoklavieren wurden 50 ml einer steril filtrierten 20%igen Glucose Lösung und 50 ml autoklaviertes H₂O_{millipore} zugeben.

SCU Expressionsmedium

SCU-Medium 400 ml

Nach dem Autoklavieren wurden 50 ml einer steril filtrierten 20%igen Galaktose-Lösung und 50 ml einer steril filtrierten 10%igen Raffinose-Lösung zugeben.

2.4. Antibiotika

Antibiotikallösungen wurden auf Vorrat hergestellt und bei -20 °C gelagert. Wässrige Lösungen wurden mit einem Spritzenfilter (Porengröße 0,2 µm) steril filtriert. Lösungen in Ethanol wurden nicht sterilisiert. Antibiotika in Festmedien wurden nach Autoklavieren und Abkühlen des Mediums auf unter 50 °C zugesetzt.

Tabelle 2-10: Verwendete Antibiotika

| | Konzentration | | |
|-----------------|------------------------|---------------------------------------|------------------|
| | Stammlösung [mg/ml] | Endkonzentration im Medium [µg/ml] | Lösungsmittel |
| Carbenicillin | 50 | 50 | H ₂ O |
| Chloramphenicol | 50 | 12,5 | Ethanol |
| Kanamycin | 50 | 50 | H ₂ O |
| Tetracyclin | 12,5 | 12,5 | Ethanol |

2.5. Puffer und Lösungen

2.5.1. Puffer und Lösungen zur Isolierung von gDNA aus Ascomyceten

10xPBS-Puffer

| | |
|----------------------------------|--------|
| NaCl | 1,37 M |
| KCl | 27 mM |
| Na ₂ HPO ₄ | 10 mM |
| KH ₂ PO ₄ | 1,8 mM |
| pH = 7,4 | |

DB-Puffer

| | |
|-----------|--------|
| NaCl | 100 mM |
| Tris-Base | 10 mM |
| EDTA | 25 mM |
| SDS (w/v) | 0,5% |
| pH = 8,0 | |

Natriumacetat

| | |
|----------|-----|
| NaOAc | 3 M |
| pH = 5,2 | |

2.5.2. Lösungen zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Lösung 1

| | |
|-----------|-------|
| Tris-Base | 50 mM |
| EDTA | 10 mM |
| pH = 8,0 | |

Vor dem Gebrauch wurde 10 µg/ml RNase zugegeben.

Lösung 2

| | |
|------|----------|
| NaOH | 0,2 M |
| SDS | 1% (w/v) |

Lösung 3

Kaliumacetat 3 M

2.5.3. Puffer und Lösungen zur DNA-Gelelektrophorese**6 x DNA Ladepuffer**

Bromphenolblau 0,25% (w/v)

Glycerin 30% (v/v)

50 x TAE-Puffer

Tris-Base 2 M

Essigsäure 6% (v/v)

EDTA (0,5 M) 50 mM

2.5.4. Puffer zur Proteinaufreinigung aus *E. coli***Lyse-Puffer**

NaH₂PO₄ 50 mM

NaCl 300 mM

Imidazol 10 mM

pH = 8,8

Wasch-Puffer

NaH₂PO₄ 50 mM

NaCl 300 mM

Imidazol 20 mM

pH = 8,8

Elutions-Puffer

NaH₂PO₄ 50 mM

NaCl 300 mM

Imidazol 250 mM

pH = 8,8

NAP-Puffer

| | |
|----------|-----------|
| Tris-HCL | 50 mM |
| Glycerin | 15% (v/v) |

2.5.5. Puffer und Lösungen zur Proteinaufreinigung aus *S. cerevisiae***Breaking-Puffer**

| | |
|-----------------|-------|
| Natriumphosphat | 50 mM |
| Glycerin | 5% |
| PMSF | 1 mM |

Natriumphosphat

| | |
|----------------------------------|-----|
| NaH ₂ PO ₄ | 1 M |
| Na ₂ HPO ₄ | 1 M |

Beides wurde getrennt steril filtriert und für eine 0,1 M Stammlösung 11,3 ml 1M NaH₂PO₄ mit 38,7 ml 1M Na₂HPO₄ vermischt.

2.5.6. Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE**10 x Laufpuffer**

| | |
|--|--------|
| Tris Base | 30,3 g |
| Glycin | 144 g |
| SDS | 10 g |
| Ad 1000 ml H ₂ O _{bidest.} | |

Sammelgel (4%) (Menge für 4 Gele)

| | |
|-------------------------------------|---------|
| H ₂ O _{bidest.} | 3 ml |
| 0,5 M Tris-HCL (pH: 6,8) | 1,25 ml |
| 10% (w/v) SDS | 50 µl |
| 30% Acrylamid | 650 µl |
| 10% (w/v) APS | 50 µl |
| TEMED | 5 µl |

Trenngel (12%) (Menge für 4 Gele)

| | |
|-------------------------------------|--------|
| H ₂ O _{bidest.} | 6,8 ml |
| 1,5 M Tris-HCL (pH: 8,8) | 5 ml |
| 10% (w/v) SDS | 200 µl |
| 30% Acrylamid/Bis Solution | 8 ml |
| 10% (w/v) APS | 100 µl |
| TEMED | 10 µl |

Trenngel 15% (Menge für 4 Gele)

| | |
|-------------------------------------|--------|
| H ₂ O _{bidest.} | 4,2 ml |
| 1,5 M Tris-HCL (pH: 8,8) | 5 ml |
| 10% (w/v) SDS | 200 µl |
| 30% Acrylamid | 10 ml |
| 10% (w/v) APS | 100 µl |
| TEMED | 10 µl |

Coomassie Färbelösung

| | |
|--------------------------------|------------|
| Coomassie Brilliant Blau G-250 | 0,1% (w/v) |
| Essigsäure | 10% (v/v) |
| Methanol | 50% (v/v) |

Entfärberlösung

| | |
|------------|-----------|
| Ethanol | 20% (v/v) |
| Essigsäure | 10% (v/v) |

2.5.7. Lösungen zur Western Blot-Analyse**Towbin-Puffer**

| | |
|---------|--------|
| Tris | 25 mM |
| Glycine | 192 mM |
| MeOH | 20% |

Stripping-Puffer

| | |
|-------------------|--------|
| Tris/HCL (pH 6,7) | 625 mM |
| β-Mercaptoethanol | 100 mM |
| SDS | 137 mM |

Farbreaktionspuffer

| | |
|--|-------|
| Tris/HCL (pH 8,8) | 50 mM |
| MgCl ₂ x 6 H ₂ O | 5 mM |

PBST-Puffer

| | |
|----------------------------------|--------------|
| KCl | 2,7 mM |
| KH ₂ PO ₄ | 1,5 mM |
| NaCl | 137 mM |
| Na ₂ HPO ₄ | 8,1 mM |
| Tween 20 | 0,05 % (v/v) |

Blockierlösung

| | |
|-------------------------|----------|
| Milchpulver | 5% (w/v) |
| ad PBST-Puffer (100 ml) | |

Antikörperlösung

Die Antikörper wurden 1:1000 in PBST-Puffer verdünnt.

Färbelösung

| | |
|---|-----------|
| BCIP (5-Brom-4-Chlo-3-Indolyl-phosphat) | 0,3 mg/ml |
| NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) | 1,5 mg/ml |

Die Färbelösung wurde in Farbreaktionspuffer gelöst.

2.5.8. Puffer und Lösungen zur Protoplastierung**Tween**

| | |
|----------|------|
| Tween 80 | 0,1% |
|----------|------|

Trapping Puffer

| | |
|---------------|--------|
| Sorbitol | 600 mM |
| Tris (pH 7,0) | 100 mM |

STC Puffer

| | |
|-------------------|-------|
| Sorbitol | 1,2 M |
| CaCl ₂ | 10 mM |
| Tris (pH 7.5) | 10 mM |

Calcium PEG

| | |
|-------------------|-------|
| CaCl ₂ | 1M |
| PEG 3350 Lösung | 60%ig |

Beides autoklavieren und für 3 ml 150 µl CaCl₂ und 2,85 ml PEG 3350 Lösung mischen.

Osmotisches Medium**Lösung A**

| | |
|----------------------------------|-------|
| NaH ₂ PO ₄ | 0,2 M |
|----------------------------------|-------|

Lösung B

| | |
|----------------------------------|-------|
| Na ₂ HPO ₄ | 0,2 M |
|----------------------------------|-------|

Lösung C

| | |
|----------|-------|
| Lösung A | 7 ml |
| Lösung B | 93 ml |

Lösungen A, B und C wurden autoklaviert.

Lösung D

| | |
|--|-------|
| Mg ₂ SO ₄ x 7 H ₂ O | 1,2 M |
|--|-------|

Das Magnesiumsulfat wurde zunächst in 60 ml H₂O_{millipore} gelöst und anschließend wurde 5 ml Lösung C zugegeben. Der pH-Wert wurde mit 2 Tropfen HCl (1M) und 30 Tropfen Na₂HPO₄ (1m) auf 5,8 eingestellt. Die Lösung wurde auf 100 ml aufgefüllt und steril filtriert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

2.6. Methoden der Mikrobiologie

2.6.1. Kultivierungsbedingungen für *E. coli*

Anzucht und Kultivierung von *Escherichia coli* erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in LB-Medium unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums zur Selektion. Flüssigkulturen wurden bei 37 °C über Nacht (16 - 18 h) auf einer Rundschüttelmaschine bei 220 rpm kultiviert (Sambrook & Russell 2001). *E. coli*-Dauerkulturen wurden durch Mischen von 600 µl einer Übernachtskultur mit 400 µl sterilem Glycerol (Endkonzentration 20% v/v) hergestellt und bei -80 °C gelagert.

2.6.2. Kultivierungsbedingungen für *S. cerevisiae*

Der Wildtypstamm von *S. cerevisiae* wurde auf YPD-Medium bei 30 °C kultiviert. Nach der Transformation erfolgte die Kultivierung bei 30 °C auf Minimalmedium ohne Uracil (SCU-Medium). Das SCU-Medium wurde nach Herstellerangaben des pYES2/NT C Vektors (Invitrogen) angesetzt. Flüssigkulturen wurden über Nacht (16 - 18 h) bei 30 °C auf einer Rundschüttelmaschine bei 280 rpm angezogen.

2.6.3. Kultivierungsbedingungen für Ascomyceten

Die Sporen der Ascomyceten wurden bei -80 °C als Glycerinkultur (siehe 2.6.5.) aufbewahrt. Unter sterilen Bedingungen wurden hiervon Petrischalen mit CDH-, mCDH-, MEP-, PD- und HA-Medium beimpft und bei entsprechender Temperatur inkubiert. Zum Animpfen von Pilzen im kleinen Maßstab (100 ml) wurden 5 µl Sporensuspension oder ein 5 x 5 mm großes Mycelagarstückchen einer Agarplatte mit CDH-, mCDH-, MEP-, PD- oder HA-Flüssigmedium überführt, im großen Maßstab (1000 ml) wurde mit 80 µl angeimpft bzw. mit 2-3 Mycelagarstückchen. Die Kulturen wurden bei RT oder 37 °C auf einer Rundschüttelmaschine bei 120 oder 0 rpm unter Lichtausschluss angezogen.

2.6.4. Herstellung einer Sporensuspension

Zur Herstellung einer Sporensuspension wurden 2 - 4 Wochen alte Platten (CDH-, mCDH-, MEP-, PD- und HA-Medium) mit dem entsprechenden Ascomyceten mit 3 ml 0,1%iger

Tween 20 Lösung mit Hilfe einer abgeschnittenen 1 ml Spitze suspendiert. Die Suspension wurde anschließend mit Hilfe dieser angeschnittenen 1 ml Spitze in ein Falcon überführt. Anschließend wurden die Platten erneut 2-mal mit je 3 ml 0,1%iger Tween Lösung suspendiert. Die Suspension im Falcon wurde anschließend mit einer Spatelspitze Glasperlen (\varnothing ca. 2mm) versetzt und 30 sec gevortext. Die Suspension wurde über Watte filtriert und bei $1700 \times g$ 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 μ l sterilem 20%igem Glycerin resuspendiert und Aliquots von 100 μ l hergestellt. Diese wurden dann mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.7. Methoden der Molekularbiologie

2.7.1. Isolierung von gDNA aus Ascomyceten

Zur Isolierung von gDNA aus Ascomyceten wurde das Mycel einer drei Tage alten Schüttelkultur (120 rpm) mit 100 ml PD-Medium über einem Büchnertrichter von dem Kulturfiltrat getrennt. Das Mycel wurde mit 1 x PBS-Puffer gewaschen und anschließend in einem in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser zu einem feinen Pulver zerrieben. Pro Gramm Mycel wurden 12 ml DB-Puffer mit Proteinase K (0,1 mg/ml) zugegeben und 2 h bei 50°C und 160 rpm inkubiert. Nach der Inkubation wurde 1 Volumenteil Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) zugefügt, 10 min auf Eis invertiert und für 7 min bei $4700 \times g$ und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und wiederholt 1 Volumenteil Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) hinzugegeben. Nach 10-minütiger Inkubationen auf Eis mit stetigem Invertieren wurde wieder 7 min bei $4700 \times g$ und 4°C abzentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Falcon überführt und die DNA wurde mit 1/10 Volumenteil Natriumacetat-Lösung und einem Volumenteil Isopropanol über Nacht bei -20°C gefällt. Am nächsten Tag wurde die DNA durch Zentrifugation bei $6800 \times g$ und 4°C für 45 min pelletiert und das Pellet anschließend mit je 3 ml eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde eine Stunde an der Luft getrocknet und in 300 μ l autoklaviertem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ aufgenommen. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C .

2.7.2. Isolierung von mRNA aus *N. fischeri* NRRL181 und Herstellung von cDNA

Zur Isolierung von mRNA aus *N. fischeri* wurde die Kulturbrühe einer 100 ml PD-Schüttelkultur (120 rpm) nach drei-tätiger Inkubation bei 25 °C über einen Büchnertrichter in Mycel und Kulturfiltrat aufgetrennt. Das Mycel wurde mit 1 x PBS Puffer gewaschen und in einem mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser zu einem feinen Pulver zerrieben. Bevor das Mycel wieder auftauen konnte, wurden ca. 100 mg in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Isolierung der RNA erfolgte mit Hilfe des E. Z. N. A. Fungal RNA Miniprep Kits (Omega Bio-Tek) nach dem Protokoll des Herstellers. Wie vom Hersteller vorgeschlagen, wurde zur Reduzierung von gDNA Rückständen ein Verdau mit DNase I während der Aufreinigung durchgeführt. Am Ende wurde die RNA zweimal mit 50 µl Diethylpyrocarbonat (DECP)-behandeltem Wasser bei 17000 x g für 1 min bei RT eluiert. Die isolierte mRNA wurde anschließend direkt mit dem ProtoScript M-MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit (NEB) in cDNA umgeschrieben. Für den Ansatz wurden 6 µl der zuvor isolierten Gesamt-RNA eingesetzt und nach dem Protokoll des Herstellers inkubiert. Als Primer wurden die Oligo d(T)₂₃VN des Herstellers verwendet.

2.7.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

E. coli Einzelkolonien wurden über Nacht bei 37 °C und 220 rpm in 4 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum kultiviert. 2 ml der Bakterienkultur wurden entnommen und bei 17000 x g für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 µl Lösung 1 durch Vortexen resuspendiert, mit 250 µl Lösung 2 gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 250 µl Lösung 3 zugegeben. Der Ansatz wurde invertiert und nach 10-minütger Inkubation auf Eis bei 17000 x g für 20 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit einem Volumen Isopropanol gefällt. Nach mehrmaligem Invertieren wurde bei 17000 x g für 30 min zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das Pellet wurde für 10 min bei 60 °C getrocknet und in 50 µl H₂O_{bidest.} aufgenommen.

2.7.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Alle in dieser Arbeit durchgeführten PCR Reaktionen wurden mit einem lab Cycler der Firma Enso Quest (Göttingen) durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) hergestellt. Ein PCR Ansatz mit *Taq*-Polymerase diente dazu, die für die jeweiligen Primer optimale Anlagerungstemperatur zu bestimmen. Je 20 µl des erhaltenen PCR Produktes wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Anschließend erfolgte eine PCR mit dem Expand High Fidelity Plus PCR System von Roche nach Herstellerangaben.

Standard PCR Ansatz mit *Taq*-Polymerase:

| | |
|---------------------------------------|-----------------------|
| <i>Taq</i> -Puffer (10x) | 1x |
| dNTP Mix 1:10 (2,5 mM von jedem dNTP) | 200 µM von jedem dNTP |
| Plasmid-DNA, cDNA bzw. gDNA | 10-100 ng |
| Primer for (c = 10 pmol/µl) | 200 nM |
| Primer rev (c = 10 pmol/µl) | 200 nM |
| <i>Taq</i> -Polymerase (1-3 U/µl) | 0,5-1,5 U |
| Gesamtvolumen 25 µl | |

Unter Verwendung der entsprechenden Primer (Tabelle 2-7) und templates wurden alle PCR Amplifikationen wie folgt durchgeführt.

Tabelle 2-11: PCR Programm mit *Taq*-Polymerase (links) bzw. Expand High Fidelity Plus PCR System (rechts)

| Temperatur | Dauer | Zyklen | Temperatur | Dauer | Zyklen |
|----------------|---------|--------|------------|---------|--------|
| 94 °C | 4 min | 1 | 94 °C | 4 min | 1 |
| 94 °C | 30 sec | 35 | 94 °C | 30 sec | 35 |
| 58 °C ± 3,5 °C | 1 min | | 55,7 °C | 1 min | |
| 72 °C | 1,3 min | | 72 °C | 1,3 min | |
| 72 °C | 7 min | 1 | 72 °C | 7 min | 1 |

2.7.5. Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe von horizontalen Agarose-Gelelektrophoresen nach ihrer Größe aufgetrennt. Dabei wurden, je nach gewünschtem Trennbereich, Agarosegele mit 0,8 bis 1,0% Agaroseanteil verwendet. Die Agarose wurde in 1 x TAE Puffer gelöst, aufgeköcht

und mit 1 × SYBR Safe DNA Gel stain (Invitrogen) versetzt. Als Laufmittel diente ebenfalls der 1 × TAE Puffer. Die Trennung erfolgte mit einer Arbeitsspannung von 130 V unter Verwendung der Compact-Midi (MBT 30 EL) Elektrophoresekammer der Firma Micro-Bio-Tec-Brand. Die Proben wurden mit dem 6 × DNA-Ladepuffer unter Verdünnung des Ladepuffers auf 1 × gemischt, damit die Beladung des Gels erfolgen konnte. Als Größenstandard diente der GeneRuler DNA Ladder Mix der Firma Fermentas. Die Detektion der Proben erfolgte mittels UV-Licht, da der SYBR Safe DNA Gel stain Farbstoff DNA-interkalierend ist.

2.7.6. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der Auftrennung der jeweiligen Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese, wurden die linearen DNA-Fragmente unter UV-Licht identifiziert und mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Die DNA wurde im nächsten Schritt mittels des HiYield PCR Clean-up und Gel-Extraktion Kit nach dem Hersteller Protokoll aus dem Agarosegel isoliert und aufgereinigt. Die Elution der DNA-Fragmente erfolgte mit Wasser.

2.7.7. Restriktion von Plasmid-DNA

Analytische Restriktionen wurden in einem Volumen von 10 µl mit verschiedenen Restriktionsenzymen in den mitgelieferten Reaktionspuffern unter den jeweils vom Hersteller angegebenen Bedingungen durchgeführt. Präparative Restriktionen zur anschließenden Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden in größeren Volumina bis zu 100 µl durchgeführt. Das Abstoppen der Reaktionen erfolgte durch Zugabe von DNA-Probenpuffer und Lagerung auf Eis.

2.7.8. Partielle Restriktion von Plasmid-DNA

Für partielle Restriktionen wurden Verdünnungsreihen von 1:10 bis 1:1000 der Enzyme NcoI und BglII hergestellt. Für die Restriktion von pBW21 mit NcoI und BglII wurde NcoI unverdünnt und BglII 1:50 verdünnt eingesetzt. Für die partielle Restriktion von pKM32 wurde mit unverdünntem BglII und 1:1000 verdünntem NcoI geschnitten. Die Inkubationen erfolgten bei 37 °C für eine Stunde.

2.7.9. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation der PCR Produkte in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy wurde mit dem unten aufgeführten Standardansatz durchgeführt.

| | |
|----------------------------|--------|
| PCR Produkt | 3,5 µl |
| Rapid Ligation Buffer (2x) | 5 µl |
| pGEM-T Easy Vector (25 ng) | 0,5 µl |
| T4 DNA Ligase (Promega) | 1 µl |

Für die Umklonierung der DNA-Fragmente aus den Klonierungsvektoren in die Expressionsvektoren wurden sowohl der Zielvektor als auch der Klonierungsvektor zunächst mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen verdaut und die Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung mittels Gelextraktion (HighYield PCR Clean-up und Gel-Extraktion Kit, SLG Südlabor, Gauting). Der Vektor und das Insert wurden direkt über eine Säule aufgereinigt und in 20 µl Wasser eluiert. Das Verhältnis der zu ligierenden DNA Fragmente wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Masse Insert [ng]} = \frac{3}{1} \times \frac{5 \times \text{Masse Vektor [ng]} \times \text{Größe Insert [bp]}}{\text{Größe Vektor [bp]}}$$

| | |
|--------------------------------------|---------------------------|
| Vector und Insert nach Gelextraktion | Insert/Vector (3/1 – 5/1) |
| T4-DNA Ligase Puffer (10x) | 2 µl |
| T4 DNA Ligase (Jena BioScience) | 1 µl |

Der Ligationsansatz wurde anschließend in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert.

2.7.10. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

2.7.10.1. Herstellung CaCl₂-kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und eine Übernachtskultur der entsprechenden Bakterien hergestellt. Mit ca. 1 ml der Vorkultur wurden 100 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft. Das Wachstum der Kultur bei 37 °C und 220 rpm wurde kontrolliert bis eine OD₆₀₀ von 0,6 vorlag (ca. 3 h). Die Zellen wurden in 50 ml Falcons überführt und bei 1700 x *g*, 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 30 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung vorsichtig resuspendiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 1700 x *g* und 4 °C für 10 min. Das Pellet wurde vorsichtig in 20 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut bei 1700 x *g* und 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung mit 15%iger Glycerinlösung resuspendiert. Die Zellen wurden in 200 µl Aliquots bei -80 °C gelagert.

2.7.10.2. Herstellung elektrokompeter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung elektrokompeter *E. coli*-Zellen wurde zunächst eine 5 ml LB-Vorkultur mit dem entsprechenden Antibiotikum und Bakterium über Nacht bei 37 °C und 220 rpm angezogen. Am nächsten Tag wurde eine 100 ml LB-Kultur mit entsprechendem Antibiotikum mit der Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Diese Kultur wurde dann bei 3000 x *g* für 5 min bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde im Rücklauf resuspendiert und mit 50 ml eiskalter 10%iger Glycerinlösung versetzt. Die Zellen wurden erneut für 5 min bei 3000 x *g* und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach erneuter Resuspension in 5 ml eiskalter 10%iger Glycerinlösung wurde der Zentrifugationsschritt erneut wiederholt und die Zellen in 2 - 5 ml eiskalter 10%iger Glycerinlösung erneut resuspendiert. Es wurden 50 µl Aliquots hergestellt und bei -80 °C gelagert.

2.7.11. Transformation von *E. coli*

2.7.11.1. Hitzeschocktransformation von CaCl_2 -kompetenten *E. coli*-Zellen

Für die Transformation wurden 200 μl der CaCl_2 kompetenten Zellen mit 1-5 μl (0,1 bis 1 μg DNA) für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 2 min bei 42 °C mit anschließender fünf minütiger Inkubation auf Eis. Zur Regeneration wurden die Zellen für eine Stunde mit 1 ml LB- oder SOC-Medium (ohne Antibiotikum) bei 37 °C inkubiert. 200 μl des Ansatzes wurden auf LB-Agarplatten mit Antibiotikum ausplattiert. Der restliche Ansatz wurde für 5 min (420 x g; 4 °C) abzentrifugiert. 800 μl des Überstandes wurden verworfen und die Zellen wurden vorsichtig in den restlichen 200 μl resuspendiert und ebenfalls auf LB-Agarplatten mit Antibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C kultiviert. Bei Transformationen mit dem Klonierungsvektor pGEM-T Easy konnte, da der Vektor das lacZ-Gen enthält, eine Blau-Weis Selektion durchgeführt werden. Um diese Selektion nutzen zu können, wurden die LB-Agarplatten mit einer Lösung aus 40 μl X-Gal - Lösung (20 mg/ml in DMF), 7 μl IPTG Lösung (1 M) und 153 μl steril filtriertem Wasser bestrichen. Das DMF musste vor dem Ausplattieren der Zellen auf Grund seiner toxischen Eigenschaften durch Abdampfen wieder entfernt werden.

2.7.11.2. Elektroporation von elektrokompetenten *E. coli*-Zellen

Zur Elektroporation wurden 50 μl elektrokompetenter *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und 3 min bei 1700 x g und 4 °C für 3 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 μl 20%iger Glycerinlösung resuspendiert. Anschließend wurde 1 μl des zu transformierenden Plasmides zu den Zellen gegeben. Es folgte die Elektroporation (MircoPulserTM Electroporator, Biorad) nach Herstellerangaben. Zur Regeneration wurden die Zellen mit 1 ml LB- oder SOC-Medium (ohne Antibiotikum) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde wie unter 2.7.11.1. beschrieben weitergearbeitet.

2.7.12. Herstellung kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen

Kompetente *S. cerevisiae*-Zellen wurden nach Herstellerangaben mit dem S. c. EasyComp TM Transformation Kit hergestellt. Hierfür wurden 10 ml YPD-Medium mit einer einzelnen Kolonie einer YPD-Agarplatte des *S. cerevisiae* INVSc1-Stammes angeimpft. Die Kultur wurde

über Nacht bei 30 °C und 280 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine neue 10 ml YPD-Kultur mit der Übernachtskultur auf eine OD₆₀₀ von 0,4 angeimpft und bei 30 °C und 280 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 500 × *g* und 22 °C für 5 min pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 10 ml der Lösung I des Kits resuspendiert und erneut bei 500 × *g* und 22 °C für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml der Lösung II des Kits resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 50 µl Aliquots erstellt, die in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert wurden.

2.7.13. Transformation von *S. cerevisiae*

Zur Transformation kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen mit den jeweiligen Plasmiden wurde das *S. c.* EasyComp™ Transformation Kit nach Herstellerangaben verwendet. Zur Transformation wurde ein 50 µl Aliquot der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und 1 µl der jeweiligen Plasmid-DNA zugegeben. Anschließend wurden 500 µl der Lösung III des Kits zu dem Ansatz gegeben und das Reaktionsgefäß durch Anstoßen durchmischt. Der Ansatz wurde dann für eine Stunde bei 30 °C inkubiert und alle 15 min erneut durchmischt. Nach der einstündigen Inkubation wurden die Zellen bei 3000 × *g* und 22 °C für 5 min pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 100 µl der Lösung III des Kits resuspendiert auf zwei Agarplatten mit SCU-Festmedium ausplattiert und für zwei bis drei Tage bei 30 °C inkubiert.

2.7.14. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde nach der Kettenabbruchmethode von der Firma Seqlab (Göttingen) durchgeführt.

2.7.15. Protoplastierung von *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*)

Für die Protoplastierung wurden zunächst 10 Agarplatten mit GMM-Medium inklusive den entsprechenden auxotrophen Markern für die *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*) Mutante von Carsten Wunsch, ca. sieben Tage mit eben diesen Transformaten bei 37 °C im Dunkeln kultiviert. Es folgte eine Sporenernte mit 2-mal 4 ml Tween-Lösung pro Platte. Die Sporen

wurden in einem 50 ml Falcon gesammelt und mit Glasperlen (\varnothing 2,85 - 3,45 mm) gut gevortext. Die Suspension wurde über steriler Watte filtriert und abzentrifugiert (4700 x g, 5 min, 4 °C). Das Pellet wurde mit 10 ml sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gewaschen und 400 ml GMM-Medium, ebenfalls mit den entsprechenden auxotrophen Markern, wurden mit den Sporen angeimpft. Nach ca. 8 - 12 h wurden die Keimlinge mikroskopiert. Sobald die Keimschläuche 2 - 3-mal so lang waren wie der Conidiendurchmesser wurde diese für 5 min bei 1700 x g und 4 °C abzentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde gewogen und in 20 - 40 ml osmotischem Medium mit 50 - 60 mg Lysozym (von *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich; Dänemark) pro Gramm Pellet für ca. 2 bis 4 h bei 30 °C und 80 rpm inkubiert. Jede halbe Stunde wurden die Protoplasten bzw. Conidien mikroskopiert. Nach dem die Protoplasten deutlich erkennbar und in ausreichender Form vorhanden waren wurden diese in 50 ml Falcons à 25 ml dekantiert und extrem vorsichtig mit 5 ml Trapping Puffer überschichtet. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 4700 x g und 4 °C konnte man 3 Phasen erkennen. Von der obersten Phase wurden vorsichtig 4 ml entnommen und in ein 15 ml Falcon überführt. Das 2 - 2,5 fache Volumen STC-Puffer wurde dazugegeben und es folgte eine Zentrifugation (4700 x g, 15 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml STC-Puffer resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt. Nach einer 20-sekündigen Zentrifugation bei 16000 x g wurde der Überstand erneut verworfen und das Pellet in 130 μl STC-Puffer resuspendiert. Für die Titer Bestimmung wurden die Protoplasten in H_2O und in STC-Puffer verdünnt (10^{-1} - 10^{-9}). Die Verdünnungsreihen wurden auf Bottom-Agarplatten mit den auxotrophen Markern für die NPRS-Transformanten ausplattiert und mit ca. 5 ml 45 °C warmen Top-Agar mit entsprechenden auxotrophen Markern überschichtet.

2.7.16. Transformation von *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*)

Zur Transformation von *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*) wurden 1 – 3 μg des gereinigten Konstruktes mit STC-Puffer auf 100 μl aufgefüllt, diese Lösung wurde vorsichtig zu 100 μl der Protoplastenlösung pipettiert und gemischt. Es folgte eine 50-minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurde der Ansatz zusammen mit 1,25 ml Calcium PEG-Lösung in ein steriles 15 ml Falcon überführt und sanft gemischt. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Transformationsansatz mit 5-6 ml STC-Puffer verdünnt. Nun wurden je 600 μl des Transformationsansatzes auf eine Bottom-Agarplatte mit den auxotrophen Markern für die Transformanten pipettiert und mit je ca. 5 ml 45 °C warmen

Top-Agar, ebenfalls mit den entsprechenden auxotrophen Markern, überschichtet. Die Platten mit den Transformanten wurden zusammen mit den Titer Platten bei 37 °C im Dunkeln über mehrere Tage inkubiert.

2.8. Methoden der Biochemie

2.8.1. Genexpression und Zellaufschluss

2.8.1.1. Genexpression in *E. coli* und Zellaufschluss

Zur Genexpression in *E. coli* wurde eine 100 ml LB-Vorkultur mit dem benötigten Antibiotikum versetzt und aus einer Dauerkultur angeimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine 1000 ml LB-Kultur mit 20 ml der Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ zwischen 0,6 bis 0,7 wurde die Genexpression mit unterschiedlichen IPTG Konzentrationen induziert. Die Expression erfolgte bei 220 rpm mit unterschiedlichen Temperaturen und Zeiten je nach Expressionsplasmid (siehe 2.2.1.). Im Anschluss wurden die Bakterien durch Zentrifugation für 8 min bei 4700 x *g* und 4 °C vom Medium getrennt. Die pelletierten Bakterien wurden in 2 ml Lyse-Puffer pro g Zellmasse resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zunächst mit Lysozym (Endkonzentration 1 mg/ml) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert, bevor die Lyse durch Ultraschall mit 6 Zyklen für je 10 sec bei 200 bis 300 W (Branson Sonifier 250) und 4 °C durchgeführt wurde. Es folgte eine Zentrifugation für 30 min bei 17000 x *g* und 4 °C. Anschließend wurde der Überstand (lösliche Proteinanteile) von den pelletierten, unlöslichen Bestandteilen getrennt. Das überproduzierte Protein wurde anschließend aus dem Lysat mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt (siehe 2.8.4)

2.8.1.2. Expression von *ftmPT1* in *E. coli*

Je 100 ml LB-Medium (mit Carbenicillin 50 µg/ml) wurden mit 3 ml Vorkultur beimpft und bei 37 °C, 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 kultiviert. Die Induktion der Gen-Expression erfolgte mit IPTG in einer Endkonzentration von 0,1 mM. 16 h nach Induktion bei 30 °C und 220 rpm wurden die Zellen durch Zentrifugation (3000 x *g*, 10 min, 4 °C) geerntet und bei -80 °C eingefroren.

2.8.2. Gewinnung von Proteinrohextrakt aus *E. coli*-Zellen

Zur Gewinnung des Proteinrohextraktes wurde der Kulturansatz 5 min bei 3000 x g (4 °C) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml Lyse-Puffer pro Gramm Pellet resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Suspension mit einem Sonifier 250 (Branson) sechsmal je 10 Sekunden lang bei 200 - 300 W behandelt. Danach wurde für 20 - 30 min bei 4 °C und 17000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde über eine Sephadex [™] G 25 NAP-5 Säule von niedermolekularen Substanzen gereinigt und in NAP-Puffer umgepuffert. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.8.3. Gewinnung von Proteinrohextrakt aus *S. cerevisiae* (Mikrosomalfraktion)

Nach der Transformation von *S. cerevisiae* mit dem jeweiligen Plasmid wurden die Zellen auf SCU Agarplatten ausgestrichen und für zwei Tage bei 30 °C inkubiert. Einzelne Kolonien wurden mittels Colony-PCR gepickt und überprüft. Mit einer positiven Kolonie wurde dann eine 250 ml Kultur mit SCU Wachstumsmedium mit 20% Glucose im 1L Erlenmeyerkolben angeimpft und bei 30 °C und 280 rpm für 24 h inkubiert. Danach wurde die OD₆₀₀ der Kultur ermittelt (1:10 verd.) und mit folgender Formel wurde die Menge der zu pelletieren Vorkultur errechnet, damit in der Hauptkultur eine OD₆₀₀ von 0,4 erreicht wurde.

$$z = \frac{\left(0,4 \times \frac{OD}{100 \text{ ml}}\right) \times 50 \text{ ml}}{y \times \frac{OD}{100 \text{ ml}}}$$

z = Menge der pelletierenden Vorkultur in ml

y = OD₆₀₀ der Vorkultur

Die errechnete Menge Vorkultur wurde in 50 ml Falcons bei 1500 x g, 5 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 20 ml glukosefreiem SCU-Medium gewaschen und anschließend wieder pelletiert (1500 x g, 5 min, 4 °C). Es folgte die Kultivierung in 500 ml SCU Expressionsmedium in einem 2000 ml Erlenmeyerkolben mit 20% Galaktose und 10% Raffinose über 24 h bei 30 °C und 280 rpm.

Nach 24 h wurde die OD₆₀₀ bestimmt und die Kultur bei 1500 x g für 5 min bei 4 °C abzentrifugiert und das Pellet in 50 ml sterilem H₂O_{bidest.} resuspendiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 6800 x g für 2 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 ml Breaking Puffer resuspendiert um anschließend bei 1500 x g bei 4 °C für 5 min wieder pelletiert zu werden. Das Pellet wurde in so viel Breaking-Puffer resuspendiert, dass die erhaltende OD₆₀₀ zwischen 50 und 100 lag. Zum Zellaufschluss wurde ein äquivalentes Volumen Glasperlen (Ø 0,4 – 0,6 mm) zugeben und das Gemisch wurde kräftig in 30 sec Intervallen gevortext und auf Eis gestellt. Dies wurde ca. 4-mal wiederholt bevor das Gemisch bei 6800 x g für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert wurde. Der Überstand wurde überführt (lösliche Fraktion) und über eine PD-10 Säule entsalzt. Es folgte eine Ultrazentrifugation bei 200000 g für 90 min bei 4 °C. Das erhaltene Pellet (UZP) wurde pro mg in 10 µl NAP-Puffer resuspendiert.

2.8.4. Reinigung von His-tag-Fusionsproteinen über Ni-NTA-Agarose

Zur Reinigung von His-tag-Fusionsproteinen wurde 1 ml zellfreier Rohextrakt mit 0,1 - 0,3 ml Ni-NTA-Agarose (NTA = Nitrilotriacetic acid) (Qiagen, Hilden) versetzt und mindestens eine Stunde auf Eis gerührt. Der Ansatz wurde anschließend in eine leere Säulenhülse gefüllt, der Durchlauf abgelassen und somit die Durchlaufraktion erhalten. Die Säule wurde zweimal mit je 4 ml Waschpuffer gewaschen und somit die Waschfraktion erhalten. Dann wurde das His₆-Fusionsprotein mit 3 x 0.5 ml Elutionspuffer eluiert. Anschließend wurden die Fraktionen über Sephadex G25 NAP-10- oder NAP-5-Säulen auf NAP-Puffer umgepuffert und bei -80 °C gelagert.

2.8.5. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-PAGE mit Sammel- und Trenngel wurde nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt. Alle verwendeten Puffer und Lösungen für die Elektrophorese wurden exakt nach den Angaben des Herstellers der verwendeten Mini-PROTEAN® 3-Elektrophorese-Zelle der Firma Bio-Rad hergestellt. Als Sammelgel wurde ein 4%iges Polyacrylamidgel verwendet. Als Trenngel diente ein 12%iges bzw. 15%iges Gel. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 180 – 200 V durchgeführt. Die zu analysierenden Proben wurden unmittelbar vor der Elektrophorese im Verhältnis 1:1 mit

Probenpuffer gemischt und 5 min bei 100 °C im Wasserbad gekocht. Nach beendeter Elektrophorese wurden die Gele für 30 bis 60 min in Coomassie-Färbelösung gefärbt. Zum Entfärben des Hintergrundes wurde zunächst mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ kurz gewaschen und anschließend mit Entfärbelösung entfärbt. Abschließend wurde das Gel mit Wasser gewaschen und zur Dokumentation eingescannt.

2.8.6. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung des Proteingehalts von Lösungen wurde eine Kalibrierungsgerade mit 1 mg/ml BSA-Lösung erstellt. Dazu wurden 1 bis 10 µg BSA mit NAP-Puffer auf 100 µl aufgefüllt und mit 1 ml Bradford-Reagenz gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm mit einem UV-Spektrometer gemessen. Es wurde eine Zweifachbestimmung durchgeführt und aus den Mittelwerten der Absorptionen die Kalibrierungsgerade erstellt. Die zu bestimmende Probe wurde vor der Verwendung mit NAP-Puffer auf ein Volumen von 100 µl gebracht und anschließend mit 1 ml Bradford Reagenz gemischt. Die Proteinlösung wurde so eingesetzt, dass die Absorption in einem Bereich von 0,3 - 0,7 lag.

2.8.7. Western-Immunoblotting

Die Proteine aus Membranfraktionen bzw. die Elutionsfraktionen von *E. coli* bzw. *S. cerevisiae* wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend in einer Tank-Blotkammer (Criterion™ Blotter, Biorad) auf eine PVDF-Membran transferiert. Dafür wurde zunächst das Gel ca. 10 min in Towbin-Puffer äquilibriert und die PVDF-Membran nach 5-minütiger Inkubation in MeOH ebenfalls in Towbin-Puffer getränkt. Die schwarze Seite (Kathode) des Gel/Membran Sandwiches wurde nach unten gelegt und über einer Schwammschicht folgte eine Schicht Blotabsorber Papier. Darauf wurde das in Transferpuffer äquilibrierte Gel und darauf luftblasenfrei die Membran gebettet. Es folgte wieder eine Schicht Blotabsorber Papier und eine Schwammschicht. Nun wurde das Sandwich mit der roten Seite (Anode) geschlossen und in den mit Towbin-Puffer gefüllten Tank gegeben. Der Transfer erfolgte bei 10 Volt über Nacht. Um die Intensität der Banden zu erhöhen, wurde die PVDF-Membran im Anschluss an den Western-Blot zwei Mal mit dem PBST-Puffer gewaschen, 15 min bei 55 °C mit Stripping-Puffer behandelt und erneut in PBST-

Puffer gewaschen. Die nachfolgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler durchgeführt. Um unspezifische Proteinbindungen zu vermeiden, wurde die Membran für 30 min bei 4 °C in Blockierlösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST-Puffer erfolgte eine zweistündige Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper (Monoklonaler Maus Anti-His-tag Antikörper, Calbiochem). Die Membran wurde anschließend drei Mal in PBST-Puffer gewaschen und für 60 min mit einem sekundären Antikörper (Anti-Maus-IgG Alkaline Phosphatase, Sigma-Aldrich) inkubiert. Beide Antikörper wurden vor Gebrauch im Verhältnis 1:1000 in PBST-Puffer verdünnt. In den nachfolgenden Waschschritten wurde die Membran drei Mal in PBST-Puffer und drei Mal im Farbreaktionspuffer gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte durch Inkubation der Membran in der Färbelösung bis eine deutliche Färbung der Banden sichtbar war. Die Farbreaktion wurde mit Wasser abgestoppt und die Membran mehrmals in Wasser gewaschen.

2.8.8. Enzymassays mit FtmPT1

Die Enzymassays mit FtmPT1 wurden bei pH 7,5 in Tris-HCL (50 mM) durchgeführt. Die aromatischen Substrate wurden in DMSO, das DMAPP in Tris-HCL-Puffer (50 mM, pH 7,5) und das Ca₂Cl in H₂O_{bidest.} gelöst. Die Assays wurden im 100 µl Ansatz durchgeführt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Das Abstoppen der enzymatischen Reaktion erfolgte mit 100 µl MeOH. Das gefällte Protein wurde bei 16000 x g pelletiert und der Überstand mittels HPLC analysiert.

Tabelle 2-12: Enzymassays mit FtmPT1

| | Stocklösung | Endkonzentration | auf 100 µl |
|-----------------------|-------------|------------------|------------|
| Tris/HCL (pH 7,5) | 50 mM | | ad 100 µl |
| Ca ₂ Cl | 100 mM | 10 mM | 10 µl |
| aromatisches Substrat | 20 mM | 1 mM | 5 µl |
| DMAPP | 100 mM | 2 mM | 2 µl |
| FtmPT1 | | 1,3 µg/100 µl | |

2.8.9. Enzymassays mit EAW19375, EAW19376, EAW19378, FtmO und FtmP

Der Standardansatz der durchgeführten Enzymassays zum Nachweis der enzymatischen Aktivität von EAW19375, EAW19376, EAW19378, FtmO und FtmP ist in folgender Tabelle dargestellt. Die Substrate wurden in DMSO, die Cofaktoren in Tris/HCL Puffer (50 mM, pH 7,5) Puffer und das CaCl_2 in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gelöst.

Tabelle 2-13: Enzymassays zum Nachweis der enzymatischen Aktivität von EAW19375, EAW19376, EAW19378, FtmO und FtmP

| | Stocklösung | Endkonzentration | auf 100 μl |
|------------------------|-------------|--|------------------------|
| Tris/HCL (pH 7,5) | 50 mM | | ad 100 μl |
| Ca_2Cl | 100 mM | 10 mM | 10 μl |
| Substrat | 20 mM | 1 mM | 5 μl |
| Cofaktoren | 100 mM | 1 oder 5 mM | 1 oder 5 μl |
| Protein | | 1,7 μg - 16,7 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ | |

Als Cofaktoren wurden je 1 mM oder je 5 mM NAD, NADP, FMN und FAD oder NADH, NADPH, FMN und FAD eingesetzt. Als Substrate dienten je 5 mM Tryprostatin B, Fumitremorgin C oder 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C. Von FtmO wurden ca. 2,1 μg , von FtmP ca. 5,5 μg , von EAW19375 ca. 1,7 μg , von EAW19376 ca. 16,7 μg und von EAW19378 je 30 μl der UZP (Pellet nach der Ultrazentrifugation) pro 100 μl Enzymassay eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über 16 h. Im Anschluss wurde 3-mal mit dem doppelten Volumen an Ethylacetat ausgeschüttelt, die vereinigte organischen Phasen wurden bis zur Trockene eingeeengt und in 200 μl MeOH zurückgelöst. Die Analysen der Proben erfolgte mittels analytischer HPLC (siehe 2.12.1.).

2.8.10. K_M -Wert-Berechnung

Zur Bestimmung der K_M -Werte enzymatischer Produkte von FtmPT1 wurden 100 μl Assay mit 0,4 μg FtmPT1 mit 10 mM CaCl_2 , 2 mM DMAPP, 30 bzw. 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Assays wurden mit 100 μl Methanol abgestoppt und mittels analytischer HPLC analysiert (siehe 2.12.1.). Zur K_M -Wert-Bestimmung wurden die Produktpeakflächen herangezogen. Da nicht ausreichend Produktproben vorlagen, um mittels einer Eichgerade der Produkte die Peakfläche einer Substanzmenge zuzuordnen, wurde die Substanzmenge der Produkte folgendermaßen ermittelt: Es wurden 10 ml Assays mit den entsprechenden Substraten

durchgeführt, welche vollständig mittels NMR und HPLC untersucht wurden. Dann wurde der jeweilige Umrechnungsfaktor ausgerechnet.

2.9. Methoden zur biologischen Charakterisierung

2.9.1. Zytotoxizitätstest

Die Zytotoxizitätstests wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Kassack in Düsseldorf durchgeführt (Müller *et al.*, 2004). Die Zellen der Zelllinie A2780 wurden in einer Konzentration 8×10^3 Zellen/Loch und die Zellen der Zelllinie K562 in einer Konzentration von 3×10^4 Zellen/Loch in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte (Corning, New York) ausgesät. Nach 24 h wurden aufsteigende Konzentrationen der zu testenden Substanzen hinzugegeben. Die Inkubation wurde nach 72 h gestoppt und das Zellüberleben mittels MTT-Färbung ermittelt.

2.9.2. MTT-Färbung

Die quantitative Auswertung der Zytotoxizitätstests erfolgte durch einen MTT-Zellproliferationstest. Der Test basiert auf der Fähigkeit von lebenden Zellen, das gelbe 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Applichem, Darmstadt) in violette Formazan-Kristalle zu metabolisieren. Der Farbumschlag kann dann anschließend spektroskopisch detektiert werden. Die Zellen wurden mit MTT Lösung (5 mg/ml in Phosphat gepufferter Saline) behandelt. Das Formazan wurde in DMSO gelöst und die Absorption wurde bei 544 und 690 nm in einem FLUOstar microplate-reader (BMG LabTech, Offenburg) gemessen. Die Absorption der unbehandelten Kontrollzellen wurde als 100% gesetzt. Alle Tests wurden 3-fach ausgeführt.

2.10. Chemische Synthese

2.10.1. Synthese von *cyclo*-D-Trp-L-Pro und *cyclo*-D-Trp-D-Pro

Zur Synthese von *cyclo*-D-Trp-L-Pro und *cyclo*-D-Trp-D-Pro wurden zunächst 4,6 mmol (1,17 g) H-D-Trp-OMe-HCl mit 9,2 mmol (1,04 ml) NMM (N-Methylmorpholin) und 5 ml trockenem DMF vermischt. Das ganze wurde auf 0 °C runtergekühlt und mit 4,6 mmol (0,99 g) N-Boc-D-Pro-OH verrührt. Anschließend wurden 4,6 mmol (0,91 g) DCC

(Dicyclohexylcarbodiimid) in 6 ml trockenem DMF gelöst und zu dem Ansatz hinzu gegeben. Der Ansatz wurde für 3 h bei 0 °C und anschließend für 18 h bei 5 °C gerührt (Cacciatore *et al.*, 2005).

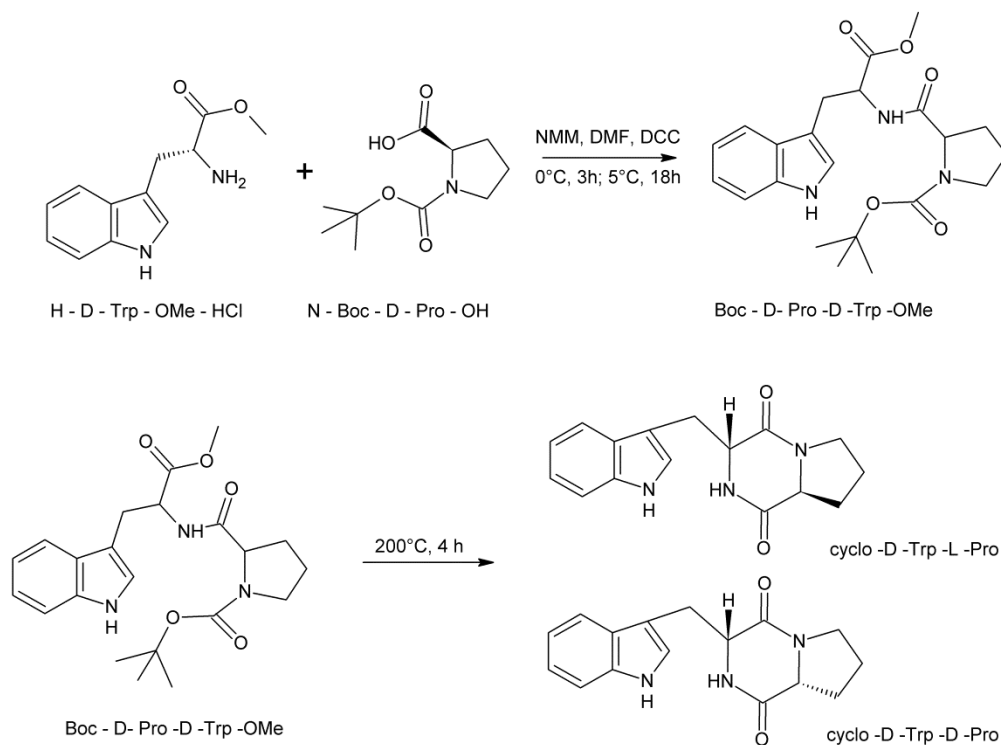


Abbildung 2-1: Syntheseschritte von *cyclo*-D-Trp-L-Pro und *cyclo*-D-Trp-D-Pro

Das Reaktionsgemisch wurde im Anschluss in 40 ml Dichlormethan gelöst, filtriert und jeweils zweimal mit 1 M HCl, H₂O und 1 M NaHCO₃ ausgeschüttelt. Die Dichlormethanphase wurde über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuumrotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Es wurde 1,36 g Zwischenprodukt (BOC-D-Pro-D-Trp-OMe) erhalten (siehe Abbildung 2-1). Ein Rundkolben wurde mit einem Septum (Gummistopfen) versehen und unter Vakuum erhitzt um H₂O und O₂ zu entfernen. Anschließend wurde die Probe in Dichlormethan gelöst und in den Kolben gespritzt, das Lösungsmittel wurde im Anschluss unter Vakuum bis zur Trockene eingengt. Mit Hilfe eines Luftballons wurde der Kolben in eine Stickstoffatmosphäre gehalten und 4 h bei 200 °C pyrolysiert (siehe Abbildung 2-2) (Caballero *et al.*, 1998). Das Produkt wurde in Aceton/Chloroform 2:1 (v/v) gelöst und über eine Kieselgelsäule mit Hilfe eines Aceton/Chloroform (2:1, 3:1, v/v) Gradienten aufgereinigt. In Reagenzgläsern wurden verschiedenen Fraktionen aufgefangen. Diese wurden mittels Dünnschichtchromatographie analysiert und entsprechend vereinigt.

2.11. Isolierung von Sekundärmetaboliten aus Ascomyceten

2.11.1. Isolierung von Fumigaclavin A aus *Penicillium commune* NRRL2033

Zur Aufreinigung von Fumigaclavin A aus *Penicillium commune* NRRL2033 wurde der Pilz in verschiedenen Medien (CDH-, mCDH-, MEP-, PD-, HA-, Weizen- und Reis-Medium) für 14 Tage kultiviert. Die Fermentation erfolgte im Falle des CDH-, mCDH-, MEP-, PD-, HA-Mediums in 750 ml Fernbachkolben bei 25 °C unter Lichtausschluss. Die Fermentation auf Weizen- und Reis-Medium erfolgte im 1000 ml Fernbachkolben mit 100 g Weizen bzw. Reis ebenfalls unter Lichtausschluss bei 25 °C. Bei den Flüssigmedien wurde das Mycel von der Kulturbrühe getrennt und mit 25%igem Ammoniak auf einem pH von 8 - 9 eingestellt und zweimal mit dem gleichen Volumen an Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuumrotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Im Falle des Weizen- und Reis-Mediums wurde die Kultur eine Stunde mit Ethylacetat auf dem Schüttler bei 120 rpm extrahiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel ebenfalls im Vakuumrotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Die Extrakte wurden in Methanol gelöst und anschließend mit 0,1 M HCl Lösung nochmals ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde mittels 25%igem Ammoniak auf einen basischen pH von 8 - 9 eingestellt und anschließend wieder mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Dieses wurde anschließend ebenfalls im Vakuumrotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Das Extrakt wurde in Methanol gelöst und in abgewogene Reaktionsgefäße überführt. Diese wurden in der Speedvac getrocknet, gewogen und in definierten Konzentrationen in Methanol aufgenommen.

2.11.2. Isolierung von Sekundärmetaboliten aus *Neosartorya fischeri* NRRL181

Zur Isolierung von Sekundärmetaboliten aus *N. fischeri* NRRL181 wurde der Ascomycet zunächst in verschiedenen Flüssigmedien (CDH-, mCDH-, MEP-, PD-, HA-Medium) (Submerskultur) im 100 ml Maßstab kultiviert. Zur Kultivierung im 4000 ml Maßstab wurden je vier 2000 ml Erlenmeyerkolben mit jeweils 1000 ml Medium (MEP-, PD- und HA-Medium)) mit 80 µl Sporensuspension angeimpft und für 14 Tage kultiviert. Die Kultivierung auf mCDH-Medium erfolgte in Fernbachkolben mit 500 ml Festmedium, angeimpft mit 100 µl Sporensuspension, ebenfalls für 14 Tage bei 25 °C als Oberflächenkultur (Emerskultur)

kultiviert. Zur Aufarbeitung wurde das Mycel von der Kulturbrühe über einen Büchnertrichter getrennt. Das Mycel wurde für eine Stunde in einem Methanol/Aceton Gemisch (1:1) bei RT auf einer Rundschüttelmaschine geschüttelt. Nach der Trennung des Lösungsmittels über einen Filter wurde dieses im Anschluss mittels Vakuumrotationsverdampfer bei 30 °C bis zur Trockene eingengt. Das Kulturfiltrat wurde mit einem äquivalenten Volumen an Ethylacetat in einem Scheidetrichter extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und am Vakuumrotationsverdampfer bei 30 °C bis zur Trockene eingengt. Die Aufbewahrung der in MeOH bzw. MeCN gelösten Extrakte (20 µg/µl) erfolgte bei -20 °C. Zur Aufreinigung in 4 l-Maßstäben wurde im Folgenden eine Adsorptionschromatographie durchgeführt. Hierzu wurde der gewonnene Rohextrakt an Kieselgel 60 (0,063 - 0,2 mm) chromatographiert. Der in Methanol bzw. MeCN gelöste Rohextrakt wurde zunächst an etwas Kieselgel gebunden und nach dem Abdampfen des Lösungsmittels auf die Kieselgelsäule aufgetragen. Für die Säule wurde die 30-fache Menge an Kieselgel 60 eingesetzt und mit dem 2 - 3 fachen Säulenvolumen eluiert. Die Elution erfolgte mit Cyclohexan:Ethylacetat und Ethylacetat:MeOH Gradienten. Die aufgefangenen Fraktionen wurden alle im Rotationsverdampfer bei 30 °C bis zur Trockene eingengt.

Tabelle 2-14: Eluenten für die Chromatographie an Kieselgel

| Kieselgelfraktionen | Eluenten | Verhältnis |
|---------------------|-------------------------|------------|
| KG 1 | Cyclohexan | 100% |
| KG 2 | Cyclohexan: Ethylacetat | 3:1 |
| KG 3 | Cyclohexan: Ethylacetat | 1:1 |
| KG 4 | Cyclohexan: Ethylacetat | 1:9 |
| KG 5 | Ethylacetat | 100% |
| KG 6 | Ethylacetat: Methanol | 3:1 |
| KG 7 | Ethylacetat: Methanol | 1:1 |
| KG 8 | Methanol | 100% |

2.11.3. Zufütterung von Tryprostatin B in *N. fischeri* NRRL181

Zur biosynthetischen Untersuchung verschiedener isolierter Verbindungen aus *N. fischeri* NRRL181 wurde der Ascomycet in zwei 50 ml Submerskulturen mit PD-Medium in 250 ml Erlenmeyerkolben mit einem Mycelagarstück (Ø 5 mm) einer gut bewachsenen *N. fischeri* NRRL181 Agarplatte (PD-Medium) angeimpft. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 120 rpm kultiviert. Nach drei Tagen wurde in einen Kolben 0,1 mM Tryprostatin B als

Endkonzentration (1,9 mg), in EtOH gelöst, hinzugegeben. Die Kulturen wurden nach 14 Tagen wie unter 2.11.2. beschrieben aufgereinigt und mittels HPLC analysiert.

2.11.4. Kultivierung und Extraktion von Sekundärmetaboliten aus *A. nidulans* BW03 (*ftmPS* + *brePT*)

Zur Kultivierung von *A. nidulans* BW03 (*ftmPS*+*brePT*) wurde der Pilz bei 30 °C bzw. 37 °C und 120 rpm als Submerskultur über fünf Tage unter Lichtausschluss kultiviert. Die 100 ml Kulturen wurden mit je zwei 5 x 5 mm großen Mycelagarstücken angeimpft. Als Medien diente CDH-, mCDH-, MEP-, PD-, HA-, GMM-, und AMM-Medium. Nach fünf Tagen wurde die Kulturbrühe über einen Büchnertrichter in Kulturfiltrat und Mycel getrennt. Die vierzehn verschiedenen Kulturfiltrate wurden im Anschluss mit einem äquivalenten Volumen an Ethylacetat 2-mal ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und bis zur Trockene eingengt. Die Extrakte wurden in einer Konzentration von 20 µg/µl zurückgelöst und mittels HPLC analysiert.

2.12. Analytische und spektroskopische Untersuchungen niedermolekularer Substanzen

2.12.1. Analytische HPLC

Die Analyse der enzymatischen Produkte und der Pilzextrakte erfolgte mittels analytischer HPLC (1200 series, Agilent, Böblingen). Die verwendete HPLC wurde durch einen Dioden-Array-Detektor unterstützt und trennte die Proben über eine RP18-Trennsäule auf (250 mm x 4 mm, Partikelgröße 5 µm) (C&S Chromatographie Service, Langerwehe). Der Trennsäule war eine RP-18 Vorsäule (30 mm x 4 mm, Partikelgröße 40 µm) (C&S Chromatographie Service, Langerwehe) vorgeschaltet. Die Proben wurden vor der Messung für 15 min bei 17000 x g abzentrifugiert oder durch einen Spritzenvorsatzfilter (13 mm, 0,2 µm, PTFE) (VWR international, Darmstadt) filtriert. Als Eluenten dienten H₂O_{bidest.}, welches zuvor über einen hydrophilic polypropylene Membran Filter (47 mm, 0,2 µm) (PALL Life science, Port Washington, NY) filtriert wurde, ohne oder mit 0,5% TFA und MeCN bzw. MeOH ohne oder mit 0,5% TFA. Die Analysen erfolgten mit einer Flussrate von 1 ml/min.

Für die Analyse der Extrakte aus *Penicillium commune* NRRL2033 wurde MeCN mit 0,5% TFA verwendet und der Gradient wurde innerhalb von 25 min von 15% MeCN auf 100% MeCN gespült.

Die Analyse der Rohextrakte von *Neosartorya fischeri* erfolgte mit MeCN. Der Gradient wurde von 0% MeCN auf 100% in 20 min gespült.

Zur Analyse der *A. nidulans* BW03 (*ftmPS+brePT*) Transformanten wurde ein Gradient von 10% MeCN auf 100% MeCN in 35 min verwendet.

Die Analyse der enzymatischen Produkte von FtmPT1 erfolgte mit einem Gradienten von 30 auf 100% MeOH in 30 min. Für die Analyse von *cyclo*-L-Trp-L-His wurde beiden Lösungsmitteln 0,5% TFA zugeführt.

Zum Nachweis der enzymatischen Aktivität von EAW19375, EAW19376, EAW19378, FtmO und FtmP wurden 100 µl der Proben injiziert und mit einem Gradienten von 30% MeCN auf 80% MeCN in 35 min aufgetrennt.

Bei allen verwendeten Methoden wurden am Ende für 5 min bei 100% MeOH bzw. MeCN gespült und anschließend 5 min mit dem Anfangsgradienten eingespült.

2.12.2. Semipräperative HPLC

Für die Isolierung der enzymatischen Produkte sowie der Isolierung der Sekundärmetabolite wurde ebenfalls eine 1200 series HPLC von Agilent verwendet. Als Säule diente eine Multospher RP-18-Säule (250 mm x 10 mm, Partikelgröße 5 µm) (C&S Chromatographie Service, Langerwehe) mit vorgeschalteter Multoprep RP-18 Vorsäule (50 mm x 10 mm, Partikelgröße 40 µm) (C&S Chromatographie Service, Langerwehe). Hier wurde eine Flussrate von 2,5 ml/min verwendet. Als Eluenten dienten H₂O_{bidest.}, welches zuvor über einen hydrophilic polypropylene Membran Filter (47 mm, 0,2µm) (PALL Life science, Port Washington, NY) filtriert wurde, ohne oder mit 0,5% TFA und MeCN bzw. MeOH ohne oder mit 0,5% TFA.

Die enzymatischen FtmPT1 Produkte wurden mit einem Gradienten von 65% MeOH auf 100% MeOH in 15 min isoliert. Für die Isolierung der Produkte von *cyclo*-L-Trp-L-His wurde wieder 0,5% TFA zu beiden Eluenten zugegeben.

Fumigaclavin A wurde mit einem Gradienten von 30% MeCN + 0,5% TFA auf 100% innerhalb von 25 min aus dem Extrakt von *P. commune* NRRL2033 isoliert.

Die verschiedenen Naturstoffe aus *N. fischeri* NRRL181 wurden mit verschiedenen MeCN/H₂O-Gradienten isoliert. Zur Trennung von 6-Methoxyspirotryprostain B und Spirotryprostatin A wurde eine MultoHigh 100 Si Säule (250 x 4 mm, 5 µm) (CS Chromatographie Service, Langerwehe) verwendet. Als Eluenten dienten MeOH und CHCl₃. Die Substanzen wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min und einem Gradienten von 100% CHCl₃ auf 90% CHCl₃ in 30 min getrennt.

2.12.3. Massenspektrometrie (MS)

Die ESI und HR-ESI Messungen wurden von Frau Dr. Laufenberg und Frau Zitzer an einem AutoSpec-Gerät der Firma Micromass (Chicago, IL) oder an einem Q-Trap 2000 von Applied Biosystems (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien) durchgeführt.

Die HPLC-MS Messungen wurden von Herrn Dr. Linne an einer Agilent 1100 (Agilent, Böblingen) mit einem LTQ-FT Ultra von Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts) durchgeführt. Als Säule diente eine Nucleodur C-18 von Macherey-Nagel (Düren).

Die Massenbestimmung des EAW19375-His₆ Proteins wurde ebenfalls von Herrn Dr. Linne durchgeführt. Hierfür wurde das Protein aus einer SDS-PAGE herausgeschnitten und in Grade Modified Trypsin (Promega) über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Probe wurde in 25 µl 10% Acetonitril mit 0,1% TFA gelöst und die massenspektroskopische Analyse erfolgte mittels eines Orbitrap Velos Pro Massenspektrometer von Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts), angeschlossen an ein Ultimate NanoRSLC-HPLC System ebenfalls von Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts) mit einer Nano C-18 RP Säule.

2.12.4. Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die isolierten enzymatischen Produkte bzw. isolierten Naturstoffe wurden zur Strukturaufklärung in der Speedvac getrocknet oder über Nacht lyophilisiert. Zur Messung wurden die Proben in deuteriertem Lösungsmittel aufgenommen (Euristop, Saint-Aubin Cedex, Frankreich), welches auch zur Kalibrierung der chemischen Verschiebung diente. Die Auswertungen der NMR Daten erfolgte mit der MestReNova (MestreLab Research, S.L., Santiago de Compostela) Software.

Die ^1H -NMR-Spektren der isolierten enzymatischen Produkte von FtmPT1 wurden entweder von Herrn Dr. Kämpchen bzw. Herrn Newel an einem JEOL ECA-500 Spektrometer (JEOL, München) oder von Frau Dr. Xie an einem Bruker AVANCE-600 Spektrometer (Bruker, Billerica, Massachusetts) gemessen. Die 2D-NMR-Spektren (HMBC, HSQC, NOESY) der isolierten Substanzen wurden ebenfalls von Frau Dr. Xie an einem Bruker AVANCE-600 Spektrometer gemessen.

Die ^1H -NMR, HMBC, HSQC und NOESY-Spektren der isolierten Naturstoffe aus *N. fischeri* NRRL181 wurden alle von Herrn Dr. Kämpchen bzw. Herrn Newel an einem JEOL ECA-500 Spektrometer gemessen.

Die NMR-Messungen des isolierten Fumigaclavin A aus *P. commune* NRRL2033 wurden von Frau Dr. Xie an einem Bruker AVANCE-600 Spektrometer durchgeführt.

2.12.5. Circular dichroismus (CD)

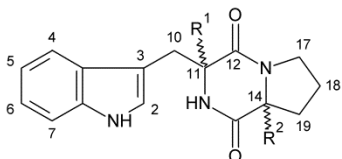
Die CD-Spektren wurden an einer Jasco J-810 (Jasco Corp., Gross-Umstadt) von 400 nm bis 200 nm gemessen. Mit einem Data Pitch von 0,1 nm wurde kontinuierlich mit einer Geschwindigkeit von 200 und einer Resonanz von 0,5 sec gemessen. Die Bandweite betrug 1 und jede Messung wurde 5-mal bei 20 °C wiederholt. Die Messungen wurden mit einer Hellma Präzisionsküvette aus Quarzglas (SUPRASIL, Typ 110-QS, Schichtdicke 1 mm, 350 µl) vorgenommen und von den Substanzen wurde je 1 mg eingesetzt.

3. Ergebnisse

3.1. Synthese von *cyclo*-D-Trp-L-Pro und *cyclo*-D-Trp-D-Pro

Nach der Aufreinigung über eine Kieselgelsäule (siehe 2.10.1) wurde das Syntheseprodukt in Reagenzgläsern aufgefangen. In den Fraktionen 41 - 50 zeigte sich das erste Produkt (238 mg) und die Fraktionen 71 - 99 enthielten das zweite Produkt (267 mg). Von den beiden Produkten wurden im Folgenden ^1H -NMR-Spektren aufgenommen. Die NMR-Spektren sind im Anhang unter 6.1 dargestellt. Zum besseren Verständnis wurden die ^1H -NMR-Spektren der Syntheseprodukte mit *cyclo*-L-Trp-L-Pro und *cyclo*-L-Trp-D-Pro verglichen und mit **1a** - **4a** nummeriert.

Tabelle 3-1: ^1H -NMR Daten von *cyclo*-L-Trp-L-Pro (**1a**), *cyclo*-L-Trp-D-Pro (**2a**), *cyclo*-D-Trp-D-Pro (**3a**), *cyclo*-D-Trp-L-Pro (**4a**). Die Spektren wurden bei 500 MHz in CDCl_3 aufgenommen.

|  | | | | |
|--|--|--|---|---|
| | 1a $\text{R}^1 = \text{---H}$ $\text{R}^2 = \text{---H}$ | 2a $\text{R}^1 = \text{---H}$ $\text{R}^2 = \text{---H}$ | 3a $\text{R}^1 = \text{---H}$ $\text{R}^2 = \text{---H}$ | 4a $\text{R}^1 = \text{---H}$ $\text{R}^2 = \text{---H}$ |
| | <i>cyclo</i> -L-Trp-L-Pro (1a) (Grundmann & Li 2005) | <i>cyclo</i> -L-Trp-D-Pro (2a) (Grundmann & Li 2005) | Produkt 1 <i>cyclo</i> -D-Trp-D-Pro (3a) | Produkt 2 <i>cyclo</i> -D-Trp-L-Pro (4a) |
| Position | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) |
| NH-1 | 8,15 br s | 8,14 br s | 8,20 br s | 8,21 br s |
| H-2 | 7,10 d (2,0) | 7,04 d (2,3) | 7,12 d (1,83) | 7,05 d (1,6) |
| H-5 | 7,57 d (7,8) | 7,60 d (7,9) | 7,59 d (7,8) | 7,61 d (7,8) |
| H-6 | 7,14 td (7,2; 1,2) | 7,11 td (7,0; 1,0) | 7,14 td (7,1; 0,9) | 7,13 t (7,4) |
| H-7 | 7,22 td (7,2; 1,2) | 7,18 td (7,0; 0,9) | 7,23 dd (8,1; 1,0) | 7,20 t (7,1) |
| H-8 | 7,38 d (8,1) | 7,34 d (8,0) | 7,40 d (8,0) | 7,36 d (8,0) |
| H-10 | 2,95 dd (15,1; 10,9) | 3,39 dd (14,6; 6,2) | 2,96 dd (15,1; 10,9) | 3,53 m |
| | 3,75 ddd (15,1; 3,0; 0,6) | 3,54 dt (12,0; 8,6) | 3,76 dd (15,1; 1,0) | 3,42 dd (14,4; 6,1) |
| H-11 | 4,36 dd (11,0; 2,8) | 4,23 dd (10,3; 4,0) | 4,37 dd (10,9; 2,6) | 4,25 dd (9,9; 4,0) |
| H-12 | 5,68 br s | 5,84 br s | 5,72 br s | 5,97 br s |
| H-14 | 4,06 t (7,6) | 2,85 dd (10,7; 6,3) | 4,07 t (7,8) | 2,82 dd (10,7; 6,4) |
| H-17 | 3,63 m | 3,17 m | 3,61 m | 3,18 m |
| H-18 | 1,91 m | 1,41 m | 1,89 m | 1,41 m |
| | | 1,70 m | | 1,71 m |
| H-19 | 2,30 m | 1,82 m | 2,33 m | 1,80 m |
| | 1,99 m | 2,07 m | 2,02 m | 2,06 m |

Die aufgenommenen ^1H -NMR-Spektren wurden mit den ^1H -NMR-Spektren von *cyclo*-L-Trp-L-Pro (**1a**) und *cyclo*-L-Trp-D-Pro (**2a**) (Grundmann & Li 2005) verglichen (siehe Tabelle 3-1.). Aufgrund der deutlichen Unterschiede der ^1H -NMR Signale der Stereozentren H-11 und H-14 der beiden Produkte (rot und grün in Tabelle 3-1 markiert) konnte das erste Syntheseprodukt als *cyclo*-D-Trp-D-Pro (**3a**) identifiziert werden und das zweite Syntheseprodukt als *cyclo*-D-Trp-L-Pro (**4a**). Auch die anderen Signale stimmten mit den jeweiligen Enantiomeren **1a** und **2a** überein. Zur Prüfung der Stereochemie wurden zusätzlich CD-Spektren von allen vier Syntheseprodukten aufgenommen. Die Spektren sind in folgender Abbildung 3-1 dargestellt.

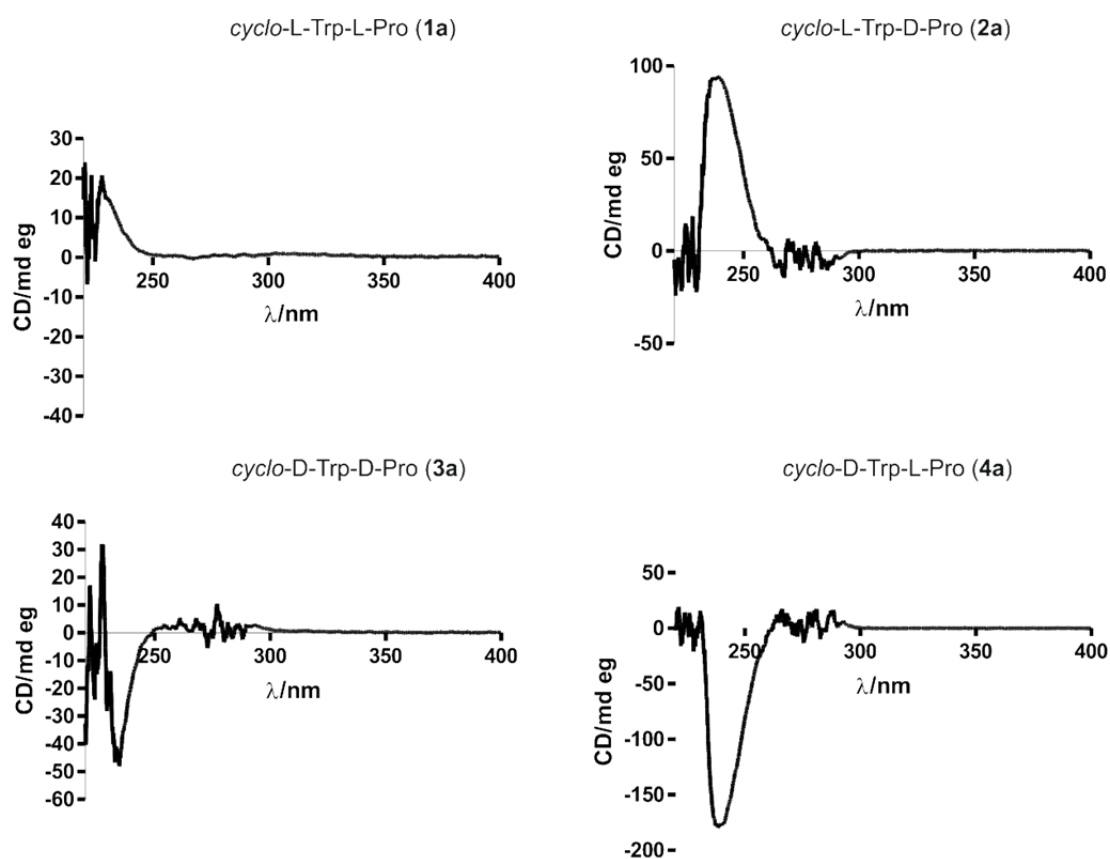


Abbildung 3-1: CD-Spektren von **1a**, **2a**, **3a** und **4a**

Da die CD-Spektren der jeweiligen Enantiomere, **1a** und **3a** bzw. **2a** und **4a**, spiegelverkehrt sind, wird zusätzlich bestätigt, dass es sich bei den beiden synthetisierten Substanzen um **3a** und **4a** handelt.

3.2. Enzymatische Reaktionen mit der Prenyltransferase FtmPT1

3.2.1. Einleitung

Die Prenyltransferase FtmPT1 aus *A. fumifatus* ist in die Biosynthese der Alkaloide des Fumitremorgin-Typs involviert. Sie katalysiert die reguläre C2-Prenylierung von *cyclo*-L-Trp-L-Pro (Brevianamid F, **1a**) zu Tryprostatin B (**1b**). FtmPT1 besitzt, wie bereits Dr. Alexander Grundmann 2005 zeigen konnte, eine breite Substratspezifität gegenüber verschiedenen zyklischen Dipeptiden, nicht jedoch gegenüber verschiedenen Prenyl-Donoren. So akzeptiert FtmPT1 nur DMAPP (Dimethylallyl diphosphat) und kein Isopentenyl bzw. Geranyl diphosphat (Grundmann & Li 2005). Für das natürliche enzymatische Produkt von FtmPT1, Tryprostatin B (**1b**), wurde bereits ein inhibitorischer Effekt auf den Zellzyklus in der G2/M Phase beobachtet (Cui *et al.*, 1996c; Zhao *et al.*, 2002). Es wurden MIC (minimal inhibitory concentration) Werte von 4,4 μ M und IC₅₀ Werte von 18,8 μ M gegenüber der Mauszelllinie tsFT210 gemessen (Cui *et al.*, 1996a; Cui *et al.*, 1996c). Außerdem wurde gezeigt, dass die Prenylierung an C-2 essentiell für die biologische Aktivität ist (Jain *et al.*, 2008; Sanz-Cervera *et al.*, 2000). Um den Einfluss der Substituenten am Diketopiperazinerings inklusive der Stereochemie an C-11 und C-14 gegenüber der biologischen Aktivität zu überprüfen, wurden verschiedene Substrate mit aliphatischen oder aromatischen Substituenten an C-14 mit FtmPT1 regulär an C2-prenyliert. Unter anderem wurden alle vier Stereoisomere von *cyclo*-Trp-Pro: *cyclo*-L-Trp-L-Pro (**1a**), *cyclo*-L-Trp-D-Pro (**2a**), *cyclo*-D-Trp-D-Pro (**3a**) und *cyclo*-D-Trp-L-Pro (**4a**) sowie alle Stereoisomere von *cyclo*-Trp-Ala: *cyclo*-L-Trp-L-Ala (**5a**), *cyclo*-L-Trp-D-Ala (**6a**), *cyclo*-D-Trp-D-Ala (**7a**) und *cyclo*-D-Trp-L-Ala (**8a**) synthetisiert und anschließend mit FtmPT1 prenyliert. Zusätzlich wurde ebenfalls *cyclo*-L-Trp-L-His (**9a**) von Frau Dr. Yu synthetisiert und freundlicherweise als Substrat zur Verfügung gestellt. Außerdem wurden die fünf bereits bekannten Substrate *cyclo*-L-Trp-Gly (**10a**), *cyclo*-L-Trp-L-Leu (**11a**), *cyclo*-L-Trp-L-Trp (**12a**), *cyclo*-L-Trp-L-Tyr (**13a**) und *cyclo*-L-Trp-L-Phe (**14a**) mit FtmPT1 umgesetzt. Insgesamt wurden demzufolge 14 verschiedene Substrate mit FtmPT1 und DMAPP umgesetzt, um die biologische Aktivität der C2-prenylierten Produkte gegenüber den unprenylierten Substraten zu testen. Zum besseren Verständnis wurden die Substrate von **1a** - **14a** und die Produkte von **1b** - **14b** durchnummeriert.

3.2.2. Überproduktion von FtmPT1

Zur Überproduktion von FtmPT1 wurde das Expressionskonstrukt pAG012 in kompetente *E. coli*-M15-Zellen transformiert und in einem 2 l-Erlenmeyerkolben mit 1 l LB-Medium bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Nach Induktion mit 0,1 mM IPTG wurden die Bakterien für weitere 16 h bei 30 °C und 220 rpm inkubiert. Die Aufreinigung des überproduzierten FtmPT1 erfolgte wie unter 2.8.4. beschrieben. In folgender Abbildung 3-2 ist die umgepufferte Elutionsfraktion nach der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose auf einer 12%igen SDS-PAGE dargestellt.



Abbildung 3-2: SDS-Gel der Elutionsfraktion von FtmPT1

Mittels Bradford-Test wurde die Proteinkonzentration des FtmPT1-His₆-Proteins auf 1,3 µg/µl bestimmt. Insgesamt konnten also 4,6 mg FtmPT1-His₆ pro Liter LB-Medium aufgereinigt werden.

3.2.3. Enzymassays zur Produktion von Tryprostatin B-Analoga

Um verschiedene Tryprostatin B-Analoga zu produzieren wurden mit dem aufgereinigten Fusionsprotein verschiedene Enzymassays wie unter 2.8.8. beschrieben durchgeführt. Als Substrate wurden neben DMAPP, **1a** - **14a** eingesetzt (siehe Abbildung 3-3).

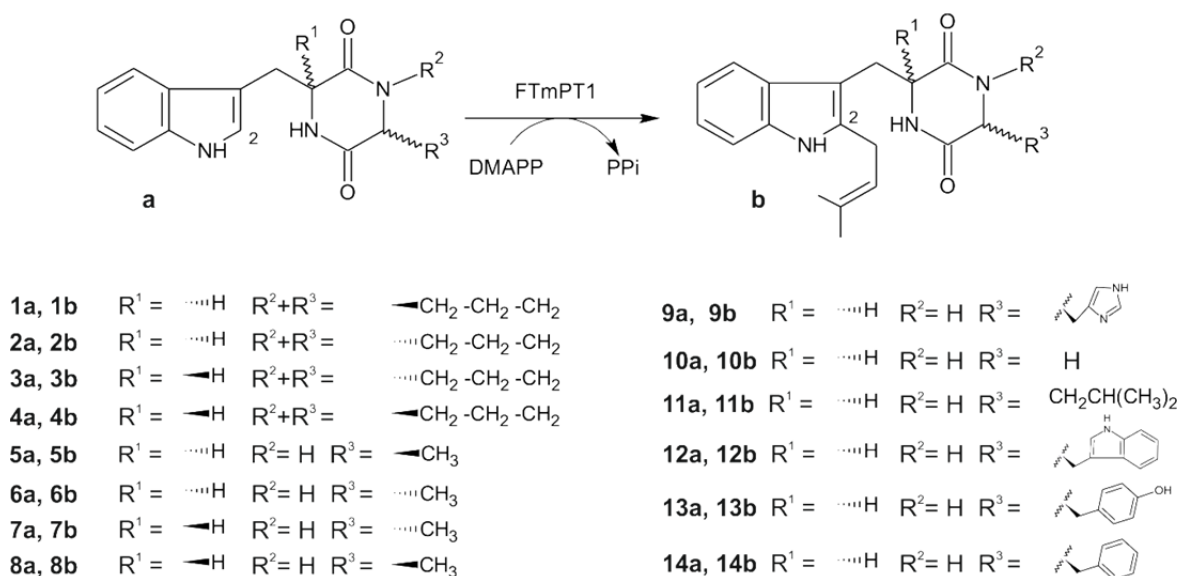


Abbildung 3-3: Produktion von verschiedenen Tryprostatin B-Analoga mit der Prenyltransferase FtmPT1

Die verschiedenen Substrate **1a** - **14a** wurden zu 8,3% bis 82,3% von der Prenyltransferase FtmPT1 umgesetzt. Die beste Umsetzung erfolgte, wie erwartet, mit dem natürlichen Substrat **1a** (siehe Tabelle 3-2).

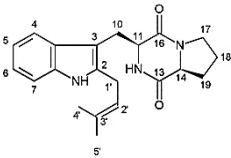
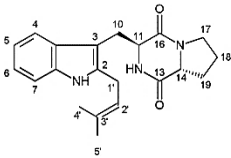
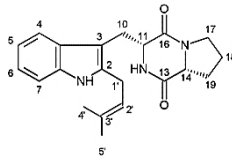
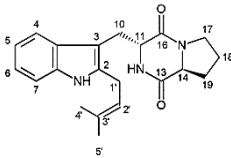
Tabelle 3-2: Umsetzung von **1a** - **14a** zu **1b** - **14b** mit FtmPT1

| Substrate | Umsatz [%] |
|--|------------|
| <i>cyclo</i> -L-Trp-L-Pro (1a) | 82,3 |
| <i>cyclo</i> -L-Trp-D-Pro (2a) | 75,7 |
| <i>cyclo</i> -D-Trp-L-Pro (3a) | 43,4 |
| <i>cyclo</i> -D-Trp-D-Pro (4a) | 27,4 |
| <i>cyclo</i> -L-Trp-L-Ala (5a) | 53,5 |
| <i>cyclo</i> -L-Trp-D-Ala (6a) | 43,9 |
| <i>cyclo</i> -D-Trp-D-Ala (7a) | 8,3 |
| <i>cyclo</i> -D-Trp-L-Ala (8a) | 46,4 |
| <i>cyclo</i> -L-Trp-L-His (9a) | 68,1 |
| <i>cyclo</i> -L-Trp-Gly (10a) | 57,0 |
| <i>cyclo</i> -L-Trp-L-Leu (11a) | 70,9 |
| <i>cyclo</i> -L-Trp-L-Trp (12a) | 67,0 |
| <i>cyclo</i> -L-Trp-L-Tyr (13a) | 72,4 |
| <i>cyclo</i> -L-Trp-L-Phe (14a) | 39,3 |

Zur Strukturaufklärung und Bestimmung der biologischen Aktivität von **1b** - **14b** wurden unter den gleichen Bedingungen 50 ml Assays mit je 1 mg FtmPT1 durchgeführt. Die Assays wurden nach 2 h 2-mal mit dem äquivalenten Volumen an Ethylacetat ausgeschüttelt und im Vakuumrotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Die Analyse und Isolierung erfolgte

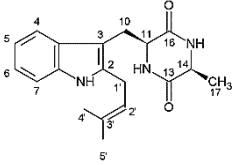
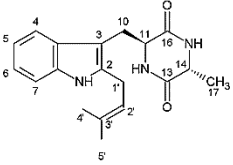
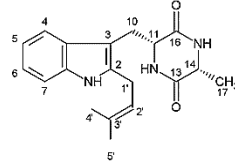
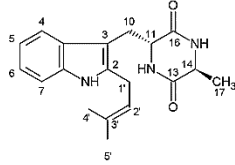
mittels semipräparativer HPLC (siehe 2.12.2.). In den folgenden Tabellen 3-3 bis 3-6 sind die ^1H -NMR Daten der isolierten Verbindungen dargestellt.

Tabelle 3-3: ^1H -NMR Daten von cyclo-C2-dimethylallyl-Trp-Pro isomeren (1b-4b). Die Spektren wurden bei 500 MHz in CDCl_3 aufgenommen.

| | <i>cyclo</i> -C2-dimethylallyl-L-Trp-L-Pro (1b) | <i>cyclo</i> -C2-dimethylallyl-L-Trp-D-Pro (2b) | <i>cyclo</i> -C2-dimethylallyl-D-Trp-D-Pro (1b) | <i>cyclo</i> -C2-dimethylallyl-D-Trp-L-Pro (4b) |
|----------|---|---|--|---|
| |  |  |  |  |
| Position | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) |
| H-1 | 7,96 s | 7,92 s | 7,93 s | 7,90 s |
| H-4 | 7,46 d (7,7) | 7,49 d (7,6) | 7,46 d (8,0) | 7,50 d 7,4 |
| H-5 | 7,09 t (7,7) | 7,07 td (7,2; 1,2) | 7,09 td (8,0; 1,1) | 7,06 td (7,2; 1,4) |
| H-6 | 7,15 t (7,7) | 7,11 td (7,2; 1,4) | 7,15 td (8,0; 1,1) | 7,09 td (7,2; 1,4) |
| H-7 | 7,31 d (7,8) | 7,27 d (7,2) | 7,30 d (8,0) | 7,28 dd (7,4; 1,5) |
| H-10 | 2,95 dd (14,8; 11,4) | 3,13 dd (14,9; 4,6) | 2,95 dd (15,0; 11,4) | 3,16 dd (14,7; 4,3)* |
| | 3,68 m | 3,45 dd (14,9; 4,8) | 3,66 dd (15,0; 4,0) | 3,42 m |
| H-11 | 4,36 dd (11,4; 2,3) | 4,24 ddd (8,6; 4,6; 0,7) | 4,36 dd (11,4; 2,8) | 4,25 dd (9,1; 4,3) |
| H-12 | 5,61 br s | 5,89 br s | 5,62 s | 5,84 s |
| H-14 | 4,05 t (8,0) | 2,71 dd (10,9, 6,4) | 4,05 t (7,6) | 2,71 dd (10,1; 6,3) |
| H-17 | 3,58 m | 3,52 m | 3,59 m | 3,54 m |
| | 3,45 m | 3,13 dd (14,6; 7,1) | 3,45 m | 3,15 dd (9,4; 2,5) * |
| H-18 | 2,02 m* | 1,81 m | 2,03 m* | 1,81 m |
| | 2,32 m | 1,35 m | 2,33 m | 1,36 m |
| H-19 | 2,02 m* | 2,01 m | 2,03 m* | 2,05 m |
| | 1,90 m | 1,65 m | 1,89 m | 1,68 m |
| H-1' | 3,48 m | 3,41 d (7,2) | 3,49 m | 3,38 m |
| H-2' | 5,30 t (7,3) | 5,27 br t (7,2) | 5,31 t (7,3) | 5,28 brt (7,3) |
| H-4' | 1,75 s | 1,75 s | 1,75 s | 1,75 s |
| H-5' | 1,78 s | 1,79 s | 1,78 s | 1,79 s |

* Signale liegen übereinander

Tabelle 3-4: ^1H -NMR Daten von *cyclo*-C2-dimethylallyl-Trp-Ala isomeren (**5b** - **8b**). Die Spektren wurden bei 500 MHz in CDCl_3 aufgenommen.

| | <i>cyclo</i> -C2-dimethylallyl-L-Trp-L-Ala (5b) | <i>cyclo</i> -C2-dimethylallyl-L-Trp-D-Ala (6b) | <i>cyclo</i> -C2-dimethylallyl-D-Trp-D-Ala (5b) | <i>cyclo</i> -C2-dimethylallyl-D-Trp-L-Ala (8b) |
|----------|---|---|--|---|
| |  |  |  |  |
| Position | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) |
| NH-1 | 7,94 s | 7,94 s | 7,94 s | 7,94 s |
| H-4 | 7,51 d (8,0) | 7,55 d (7,8) | 7,51 d (7,7) | 7,53 d (8,6) |
| H-5 | 7,10 td (8,0; 1,1) | 7,12 td (8,0; 1,1) | 7,10 td (7,7; 1,1) | 7,08 td (8,6; 1,1) |
| H-6 | 7,13 td (8,0; 1,1) | 7,15 td (8,0; 1,1) | 7,13 td (7,7; 1,1) | 7,14 td (8,6; 1,1) |
| H-7 | 7,30 d (8,0) | 7,29 d 8,0 | 7,29 d (7,7) | 7,29 d (8,0) |
| H-10 | 3,52 dd (14,8; 3,7) 3,10 dd (14,8; 9,7) | 3,38 dd (14,8; 4,0) 3,20 dd (14,8; 8,2) | 3,52 dd (14,9; 3,7) 3,08 dd (14,9; 9,7) | 3,38 dd (14,8; 4,0) 3,19 dd (14,8; 8,6) |
| H-11 | 4,30 m | 4,28 m | 4,30 m | 4,26 m |
| NH-12 | 5,90 s ^a | 5,83 s ^b | 5,79 s ^c | 5,89 s ^d |
| H-14 | 4,03 q (7,1) | 3,51 q (7,0) | 4,03 dt (7,1; 1,4) | 3,52 q (6,9) |
| NH-15 | 5,77 s ^a | 5,8 s ^b | 5,69 s ^c | 5,80 s ^d |
| H-17 | 1,26 d (7,1) | 1,35 d (7,0) | 1,28 d (6,9) | 1,34 d (6,9) |
| H-1' | 3,47 d (7,5) | 3,46 d (7,0) | 3,47 d (7,1) | 3,46 d (7,1) |
| H-2' | 5,30 t (7,5) | 5,30 t (7,2) | 5,31 t (7,1) | 5,30 t (7,1) |
| H-4' | 1,75 s | 1,76 s | 1,75 s | 1,76 s |
| H-5' | 1,79 s | 1,80 s | 1,79 s | 1,79 s |

a, b, c, d: Signale mit den gleichen Buchstaben sind austauschbar

Tabelle 3-5: ^1H -NMR Daten von *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-L-His (**9b**), *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-Gly (**10b**) in CD_3OD und *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-L-Leu (**11b**) in CDCl_3 . Die Spektren wurden bei 500 MHz aufgenommen.

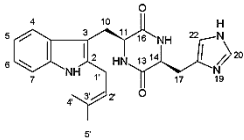
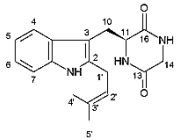
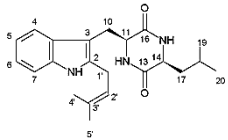
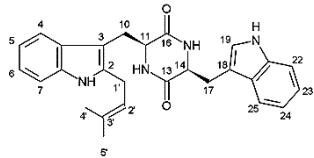
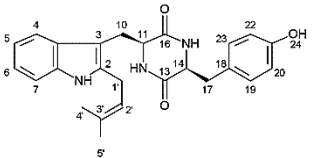
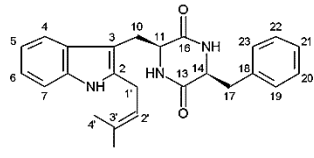
| | <i>cyclo</i> -C2-dimethylallyl-L-Trp-L-His (9b) | <i>cyclo</i> -C2-dimethylallyl-L-Trp-Gly (10b) | <i>cyclo</i> -C2-dimethylallyl-L-Trp-L-Leu (11b) |
|----------|---|---|---|
| |  |  |  |
| Position | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) |
| H-1 | - | - | 7,95 s |
| H-4 | 7,6 dt (8,0; 0,8) | 7,48 d (7,41) | 7,55 d (7,25) |
| H-5 | 7,05 ddd (7,9; 7,0; 1,1) | 6,93 td (6,9; 1,0) | 7,11 td (7,4; 1,1) |
| H-6 | 7,11 ddd (8,0; 7,0; 1,2) | 6,98 td (6,93; 1,1) | 7,15 td (7,5; 1,2) |
| H-7 | 7,31 dt (8,0; 0,9) | 7,25 d (8,07) | 7,3 td (7,6; 1,0) |
| H-10 | 3,08 dd (15,0; 4,7) | 3,10 dd (14,8; 4,6) | 3,19 dd (14,7; 8,8) |
| | 5,54 dd (14,8; 3,0) | 3,42 dd (14,4; 3,7) | 3,44 dd (14,7; 3,9) |
| H-11 | 4,29 ddd (4,6; 3,0; 0,8) | 4,13 t (4,17) | 4,30 m |
| H-12 | - | - | 5,57 s |
| H-14 | 3,67 ddd (10,9; 5,2; 0,8) | 3,22 d (17,5) | 3,98 m |
| | | 2,39 d (17,5) | |
| H-15 | - | - | 5,92 s |
| H-17 | 0,86 dd (14,5; 10,8) | - | 1,62 m |
| | 2,38 dd (14,6; 3,8) | | |
| H-18 | - | - | 1,05 m |
| H-19 | - | - | 0,86 d (6,55) |
| H-20 | 8,60 d (1,4) | - | 0,84 d (6,46) |
| H-22 | 5,22 s | - | - |
| H-1' | 3,51 d (7,6) | 3,44 d (8,5) | 3,48 d (7,85) |
| H-2' | 5,35 tt (7,3) | 5,32 m | 5,33 m |
| H-4' | 1,77 s | 1,75 s | 1,77 s |
| H-5' | 1,77 s | 1,75 s | 1,81 s |

Tabelle 3-6: ^1H -NMR Daten von *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-L-Trp (**12b**) in CDCl_3 , *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-L-Tyr (**13b**) und *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-L-Phe (**14b**) in CD_3OD . Die Spektren wurden bei 500 MHz aufgenommen.

| | <i>cyclo</i> -C2-dimethylallyl-L-Trp-L-Trp (12b) | <i>cyclo</i> -C2-dimethylallyl-L-Trp-L-Tyr (13b) | <i>cyclo</i> -C2-dimethylallyl-L-Trp-L-Phe (14b) |
|----------|---|--|---|
| |  |  |  |
| Position | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) |
| H-1 | 7,98 s | - | - |
| H-4 | 7,49 d (8,02)* | 7,51 d (7,5) | 7,25 d (7,7) |
| H-5 | 7,09 m ^a | 7,00 td (7,7; 1,3) | 7,05 td (6,8, 1,1)* |
| H-6 | 7,14 m ^a | 7,05 td (7,7; 1,2) | 7,01 td (6,8, 1,1)* |
| H-7 | 7,27 d (7,45) | 7,7 d (7,25) | 7,55 d (8,0) |
| H-10 | 3,02 dd (14,7; 7,2) | 3,11 dd (14,8; 4,8) | 3,13 dd (14,8, 4,6) |
| | 3,22 dd (14,89; 3,72) | 3,05 dd (14,8; 4,2) | 3,06 dd (14,8, 4,3) |
| H-11 | 4,26 m | 4,17 t (4,2) | 4,19 t (4,0) |
| H-12 | 5,63 br s | - | - |
| H-14 | 4,11 d (10,02) | 3,77 dd (9,7; 2,8) | 3,82 dd (9,7, 4,1) |
| H-15 | 5,77 s | - | - |
| H-17 | 3,28 dd (17,03; 3,15) | 2,52 dd (13,6; 3,5) | 2,59 dd (13,2, 3,6) |
| | 2,03 dd (14,32; 10,31) | 1,14 dd (13,5; 9,6) | 1,16 dd (13,2, 9,8) |
| H-19 | 6,27 s | 6,29 d (8,4) ^a | 7,09 t (3,1) [#] |
| H-20 | 7,95 s | 6,54 dt (8,5; 1,9) ^b | 6,44 m ⁺ |
| H-21 | | | 6,97 td (8,8, 1,7)* |
| H-22 | 7,31 d (8,02) | 6,54 dt (8,5; 1,9) ^b | 6,44 m ⁺ |
| H-23 | 7,17 m ^a | 6,29 d (8,4) ^a | 7,09 t (3,1) [#] |
| H-24 | 7,13 m ^a | - | - |
| H-25 | 7,49 d (8,02)* | - | - |
| H-1' | 3,65 t (6,01) | 3,47 d (7,1) | 3,47 d (7,2) |
| H-2' | 5,30 t (7,45) | 5,35 tt (7,2; 1,4) | 5,35 t (7,3) |
| H-4' | 1,77 s | 1,77 s | 1,77 s |
| H-5' | 1,81 s | 1,78 s | 1,78 s |

^{a, b} Signale mit den gleichen Buchstaben sind austauschbar

^{*, #, +} Signale liegen übereinander

Die ^1H -NMR Daten von **1b**, **2b**, **4b**, **10b** - **14b** wurden mit den Daten aus der Literatur verglichen (Grundmann & Li 2005; Jain *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009) und stimmten bis auf eine Abweichung von maximal 0,07 ppm überein. Nur bei **14b** kam es zu Abweichungen von bis zu 0,54 ppm, dies ist jedoch an unterschiedlichen NMR Lösungsmitteln auszumachen. Das ^1H -NMR-Spektrum von *cyclo*-C2-dimethylallyl-D-Trp-D-Pro (**3b**) war, wie erwartet, identisch

mit dem Spektrum des Enantiomeres **1b**. In allen ^1H -NMR-Spektren konnten die Signale einer regulären Prenylierung bei δ_{H} 3,38-3,49 (d oder m, 2H-1'), 5,28-5,35 (t oder tt, 2H-2'), 1,75-1,77 (s, 3H-4') und 1,77-1,80 (s, 3H-5') beobachtet werden. Zusätzlich wurde in keinem der Spektren das H-2 Signal bei δ_{H} 7,01-7,12 (d) detektiert, was für eine Prenylierung am Indolring an Position C-2 spricht. Zur Bestätigung der Monoprenylierung wurden zusätzlich ESI-MS-Spektren der Verbindungen aufgenommen, diese wiesen alle 68 Da größere Massen auf, als die entsprechenden Substrate. Die ^1H -NMR-Spektren und die ESI-MS-Spektren sind im Anhang unter 6.2. zu finden. Um die Protonen am Prolinring richtig zuordnen zu können, wurde von **2b** zusätzlich ein ^{13}C -NMR ein COSY- und ein HMQC-Spektrum aufgenommen, auch diese sind im Anhang unter 6.2. zu finden.

3.2.4. Zytotoxische Aktivität der Tryprostatin B-Analoga

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Kassack aus Düsseldorf wurde die zytotoxische Aktivität der prenylierten Produkte gegenüber der Leukämie Zelllinie K562 und den menschlichen Eierstockkrebs Zelllinien A2780 sens und cisR wie unter 2.9.1. und 2.9.2. beschrieben getestet. Als Negativkontrollen dienten die unprenylierten Substrate. In den nachfolgenden Abbildungen 3-4 bis 3-6 sind die Ergebnisse des MTT-Zellproliferationstestes nach 72 h und Konzentrationen der zu testenden Substanzen von 100 μM graphisch dargestellt.

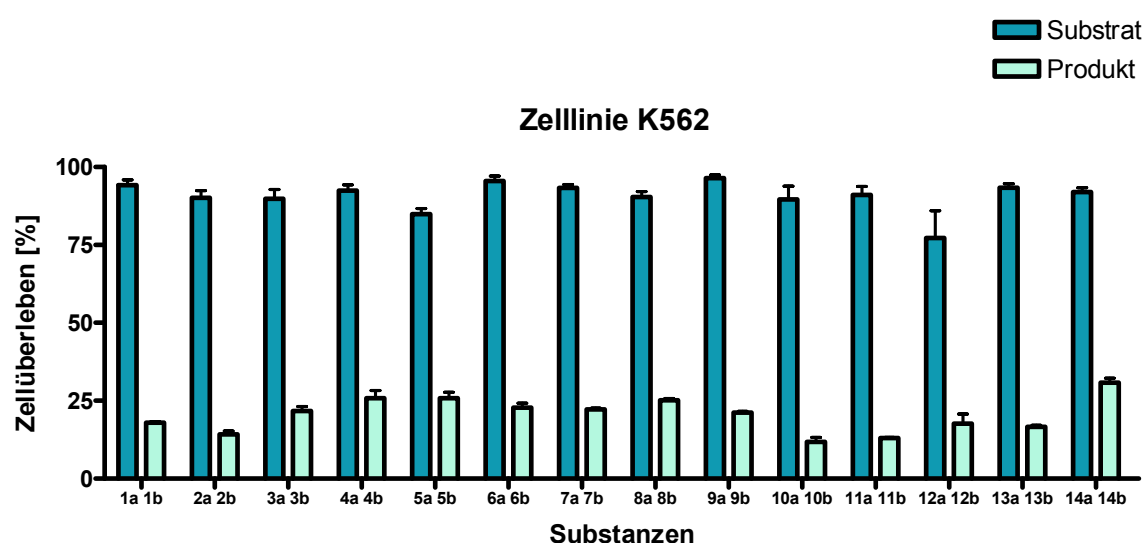


Abbildung 3-4: Zellüberleben der Krebszelllinie K562 gegenüber 1a - 14a und 1b - 14b in Konzentrationen von 100 μM

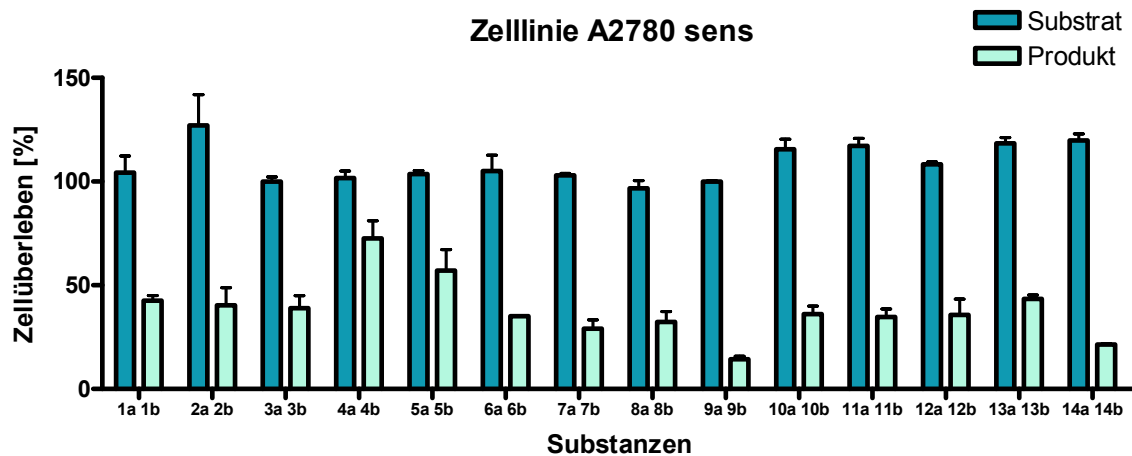


Abbildung 3-5: Zellüberleben der Krebszelllinie A2780 sens gegenüber 1a - 14a und 1b - 14b in Konzentrationen von 100 μ M

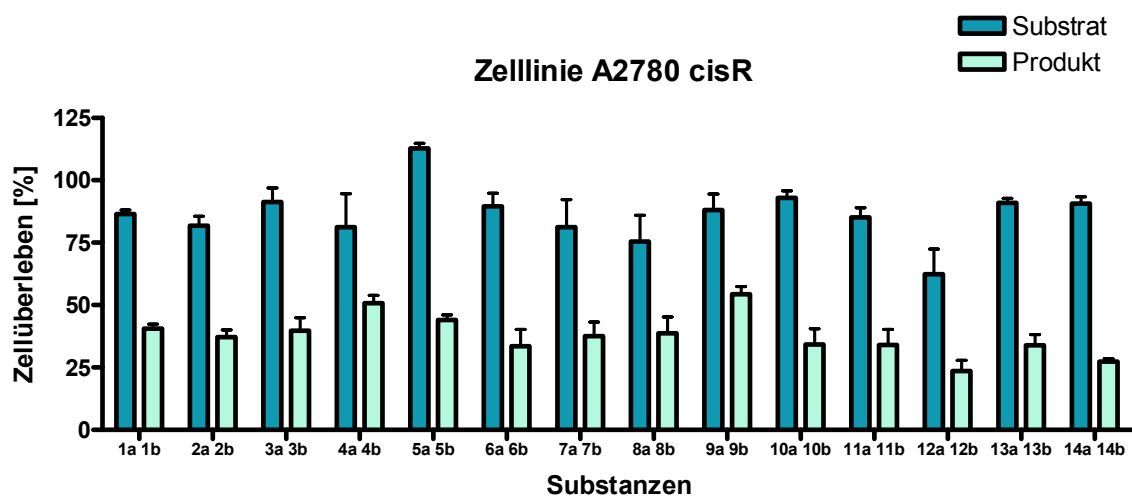


Abbildung 3-6: Zellüberleben der Krebszelllinie A2780 cisR gegenüber 1a - 14a und 1b - 14b in Konzentrationen von 100 μ M

In den obigen drei Abbildungen 3-4 bis 3-6 kann man erkennen, dass alle prenylierten Produkte (**1b - 14b**) eine deutlich erhöhte zytotoxische Wirkung gegenüber den getesteten Zelllinien aufwiesen als die unprenylierten Substrate **1a - 14a**. So war das Zellüberleben der beiden Zelllinien A2760 sens und CisR gegenüber den unprenylierten Substraten **1a - 14a** mit Werten von 62 - 100% deutlich höher als bei den prenylierten Produkten **1b - 14b**, hier überlebten durchschnittlich 35% der Zellen. Die Zelllinie K562 hingegen war mit einer prozentualen Überlebensgrenze von 77 - 96% gegenüber den unprenylierten Substraten **1a - 14a** sensibler als die anderen beiden Zelllinien. So lag hier die prozentuale

Überlebensgrenze der prenylierten Produkte **1b - 14b** bei durchschnittlich nur 20,5%. Zusätzlich zum prozentualen Überleben der Zellen wurden die entsprechenden IC₅₀-Werte ermittelt (siehe Tabelle 3-7).

Tabelle 3-7: IC₅₀ Werte (µM) der unprenylierten und prenylierten tryptophanhaltigen zyklischen Dipeptide gegenüber der Leukämie Zelllinie K562 und den menschlichen Eierstockkrebs Zelllinien A2780 sens und cisR

| K562 | | | A2780 sens | | | A2780 CisR | | | | | |
|--------------|-------|------------|--------------|-----|------------|--------------|------|------------|-------|-----|------|
| unprenyliert | | prenyliert | unprenyliert | | prenyliert | unprenyliert | | prenyliert | | | |
| 1a | > 100 | 1b | 21,1 | 1a | > 100 | 1b | 82,8 | 1a | > 100 | 1b | 85,9 |
| 2a | > 100 | 2b | 34,7 | 2a | > 100 | 2b | 106 | 2a | > 100 | 2b | 92,0 |
| 3a | > 100 | 3b | 40,4 | 3a | > 100 | 3b | 100 | 3a | > 100 | 3b | 87,8 |
| 4a | > 100 | 4b | 30,9 | 4a | > 100 | 4b | 93,1 | 4a | > 100 | 4b | 85,6 |
| 5a | > 100 | 5b | 35,2 | 5a | > 100 | 5b | 89,8 | 5a | > 100 | 5b | 82,2 |
| 6a | > 100 | 6b | 34,5 | 6a | > 100 | 6b | 77,2 | 6a | > 100 | 6b | 77,0 |
| 7a | > 100 | 7b | 34,7 | 7a | > 100 | 7b | 85,0 | 7a | > 100 | 7b | 81,1 |
| 8a | > 100 | 8b | 35,3 | 8a | > 100 | 8b | 86,2 | 8a | > 100 | 8b | 84,3 |
| 9a | > 100 | 9b | 32,2 | 9a | > 100 | 9b | 91,8 | 9a | > 100 | 9b | 91,7 |
| 10a | > 100 | 10b | 16,7 | 10a | > 100 | 10b | 82,4 | 10a | > 100 | 10b | 85,2 |
| 11a | > 100 | 11b | 30,1 | 11a | > 100 | 11b | 92,6 | 11a | > 100 | 11b | 75,0 |
| 12a | > 100 | 12b | 29,8 | 12a | > 100 | 12b | 89,7 | 12a | > 100 | 12b | 80,8 |
| 13a | > 100 | 13b | 31,6 | 13a | > 100 | 13b | 89,8 | 13a | > 100 | 13b | 83,3 |
| 14a | > 100 | 14b | 70,4 | 14a | > 100 | 14b | 87,0 | 14a | > 100 | 14b | 81,6 |

Die Ergebnisse der IC₅₀-Werte zeigen ebenfalls deutlich, dass die Prenylierung am Indolring zu einer signifikanten Erhöhung der Zytotoxizität führte. So wiesen alle unprenylierten Substrate **1a - 14a** IC₅₀-Werte von > 100 µM auf. Alle getesteten prenylierten Produkte **1b - 14b** wiesen eine höhere Toxizität auf mit IC₅₀-Werten im niedrigen bis mittleren Mikromolar Bereich für K562 und im höheren Mikromolar Bereich für A2780 Zellen. Wie man bereits in der graphischen Abbildung gesehen hat, wird hier auch deutlich, dass die Leukämie Zelllinie K562 deutlich sensibler gegenüber den getesteten Substanzen ist, als die beiden anderen Zelllinien. In den von Prof. Kassack durchgeführten Assays wiesen alle vier Stereoisomere (**1b - 4b**) ähnliche IC₅₀-Werte gegenüber den getesteten Zelllinien auf. Auch die vier *cyclo*-Trp-Ala Stereoisomere **5b - 8b** wiesen ähnliche IC₅₀-Werte auf.

3.2.5. Isolierung und Strukturaufklärung weiterer Produkte der Prenyltransferase FtmPT1

Im Zuge der semipräparativen Isolierung der C2-prenylierten Diketopiperazine **1b** - **14b** wurden in den HPLC-Chromatogrammen zusätzliche Produktpeaks mit unterschiedlichen Umsätzen detektiert. In folgender Abbildung 3-7 sind diese HPLC-Chromatogramme dargestellt.

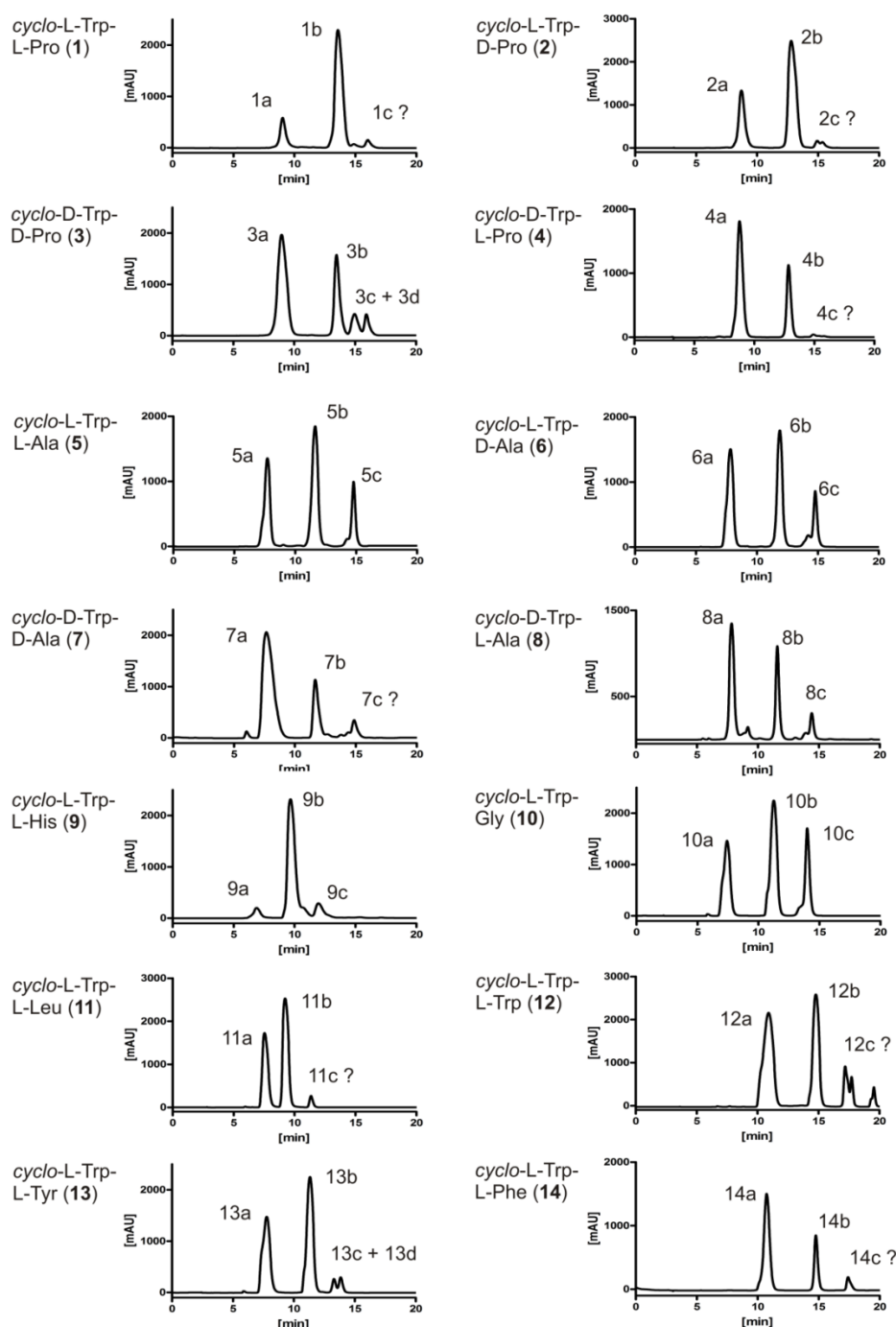


Abbildung 3-7: HPLC-Chromatogramme der Enzymassays mit FtmPT1 und den 14 zyklischen Dipeptiden, bei 296 nm

In den HPLC-Chromatogrammen kann man eindeutig sehen, dass beim natürlichen Substrat **1a** neben dem Hauptprodukt **1b** nur sehr wenig **1c** produziert wurde. Auch die Diastereomere **2a** und **4a** sowie **11a** produzierten hauptsächlich ein dominantes Produkt. Der zweite Produktpeak (**c**-Reihe) wies mit den Substraten **5a**, **6a** und **10a** die größten Umsätze auf. Neben den C2-prenylierten Produkten konnten bei **3a** und **13a** sogar 2 weitere Produkte (**c**- und **d**-Reihe) beobachtet werden. Zum besseren Vergleich der Produktion der verschiedenen Reihen sind die Umsätze im 100 µl Maßstab mit 1,3 µg FtmPT1 in folgender Tabelle 3-8 dargestellt.

Tabelle 3-8: Umsatz der Diketopiperazine 1a - 14a zu prenylierten Produkten mit der Prenyltransferase FtmPT1^a

| Substrate | Nicht umgesetztes Substrat (%) | Umsatz zu Produkt b [%] | Umsatz zu Produkt c [%] | Umsatz zu Produkt d [%] |
|------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 1a | 7,0 | 82,3 | 0,7 | - |
| 2a | 20,9 | 75,7 | 3,4 | - |
| 3a | 44,8 | 43,4 | 11,8 ^b | 10,5 ^b |
| 4a | 70,8 | 27,4 | 1,8 ^c | - |
| 5a | 33,8 | 53,5 | 12,7 ^b | - |
| 6a | 44,0 | 43,9 | 12,1 ^b | - |
| 7a | 86,3 | 8,3 | 5,4 ^c | - |
| 8a | 42,0 | 46,4 | 11,6 ^b | - |
| 9a | 25,1 | 68,1 | 6,8 ^b | - |
| 10a | 24,4 | 57,0 | 18,6 ^b | - |
| 11a | 28,2 | 70,9 | 0,9 ^c | - |
| 12a | 29,2 | 67,0 | 3,8 ^c | - |
| 13a | 26,5 | 72,4 | 1,1 ^b | 1,6 ^b |
| 14a | 56,1 | 39,3 | 4,6 ^c | - |

^a Reaktionen im 100 µl Maßstab mit 1,3 µg FtmPT1, 10 mM CaCl₂, 2 mM DMAPP und 1 mM . Detektion bei 296 nm

^b Die Produkte wurden über HPLC isoliert und mittels ¹H-NMR und MS charakterisiert

^c Die Produkte wurden mittels HPLC isoliert und mittels HR-ESI-MS identifiziert

Unter diesen Bedingungen wurden bei fünf Substraten **3a**, **5a**, **6a**, **8a** und **10a** Produktumsätze der **c**-Reihe von über 10% beobachtet. Der Produktumsatz von **10c** (18,6%) betrug ein Drittel vom Produktumsatz von **10b**. Der Produktumsatz der **c**-Reihe im Inkubationsansatz von **3a**, **5a**, **6a** und **8a** lag bei einem Viertel im Vergleich zur **b**-Reihe. Der Umsatz der **d**-Reihe bei **3a** und **13a** betrug sogar fast bzw. über 100% im Vergleich zur **c**-Reihe.

3.2.5.1. Strukturaufklärung der c-Reihe

Zur Strukturaufklärung der **c**-Reihe wurden die Produkte von **3a** - **14a** mittels semipräparativer HPLC (siehe 2.12.2.) isoliert. Die UV-Spektren der isolierten Produkte zeigten alle das gleiche charakteristische UV-Spektrum mit maximaler Absorption bei 240 und 290 nm. Diese unterschieden sich deutlich von dem charakteristischen UV-Spektrum der **b**-Reihe mit maximaler Absorption bei 220 und 280 nm (siehe Abbildung 3-8).

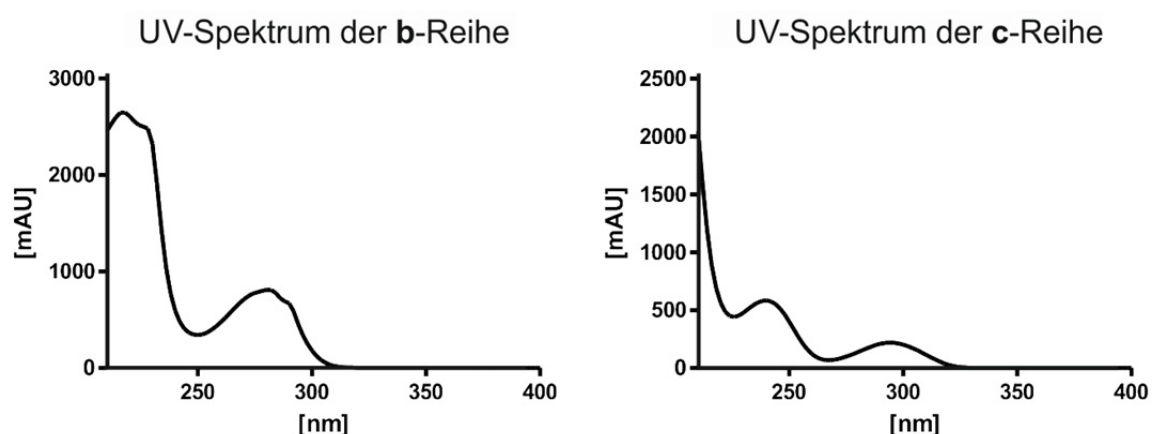


Abbildung 3-8: Charakteristische UV-Spektren der b- und c-Reihe

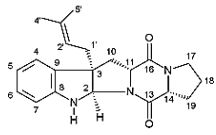
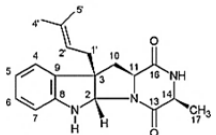
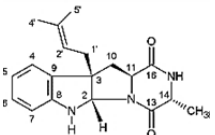
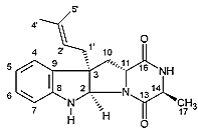
Des Weiteren wiesen die UV-Spektren der **c**-Reihe Ähnlichkeiten mit den UV-Spektren der C3-prenylierten Indoline auf, welche aus einem Inkubationsansatz mit AnaPT oder CdpC3PT identifiziert wurden (Yin *et al.*, 2010a; Yin *et al.*, 2010b). Dies ist das erste Anzeichen dafür, dass es sich bei der **c**-Reihe um ein Hexahydropyrrolo[2,3-b]indole System handeln könnte. Nach erfolgreicher Isolierung der Produkte der **c**-Reihe wurden von **3c**, **5c**, **6c**, **8c**, **9c**, **10c** und **13c** verschiedene NMR-Spektren aufgenommen, welche im Anhang unter 6.3. zu finden sind. Von **4c**, **7c**, **11c**, **12c** und **14c** wurden aufgrund geringer Substanzmengen lediglich HR-ESI-MS-Spektren aufgenommen. Die HR-ESI-MS Daten sind in folgender Tabelle 3-9 dargestellt.

Tabelle 3-9: HR-ESI-MS Daten der enzymatischen Produkte der c-Reihe

| Substanz | HR-ESI-MS Daten | | | |
|------------|----------------------|---------------------|----------|------------------|
| | Chemische Formel | berechnet | gemessen | Abweichung [ppm] |
| 3c | $C_{21}H_{25}N_3O_2$ | 374,1844 $[M+Na]^+$ | 374,1840 | 1,3 |
| 4c | $C_{21}H_{25}N_3O_2$ | 374,1844 $[M+Na]^+$ | 374,1834 | 2,7 |
| 5c | $C_{19}H_{23}N_3O_2$ | 348,1688 $[M+Na]^+$ | 348,1672 | 4,7 |
| 6c | $C_{19}H_{23}N_3O_2$ | 348,1688 $[M+Na]^+$ | 348,1667 | 6,0 |
| 7c | $C_{19}H_{23}N_3O_2$ | 348,1688 $[M+Na]^+$ | 348,1690 | 0,5 |
| 8c | $C_{19}H_{23}N_3O_2$ | 348,1688 $[M+Na]^+$ | 348,1671 | 4,8 |
| 9c | $C_{22}H_{25}N_5O_2$ | 392,2087 $[M+H]^+$ | 392,2087 | 0,2 |
| 10c | $C_{18}H_{21}N_3O_2$ | 334,1531 $[M+Na]^+$ | 334,1559 | 8,2 |
| 11c | $C_{22}H_{29}N_3O_2$ | 390,2157 $[M+Na]^+$ | 390,2172 | 3,6 |
| 12c | $C_{27}H_{28}N_4O_2$ | 463,2110 $[M+Na]^+$ | 463,2131 | 4,5 |
| 13c | $C_{25}H_{27}N_3O_3$ | 440,1951 $[M+Na]^+$ | 440,1915 | 7,9 |
| 14c | $C_{25}H_{27}N_3O_2$ | 424,2001 $[M+Na]^+$ | 424,2008 | 1,7 |

Da die $[M+Na]^+$ oder $[M+H]^+$ Ionen 68 Dalten größer waren als die der entsprechenden Substrate konnte mittels HR-ESI-MS (positive high resolution electrospray ionization) eine Monoprenylierung der c-Reihe bestätigt werden. Die 1H - und ^{13}C -NMR Daten der isolierten Substanzen sind in folgenden Tabellen 3-10 und 3-11 dargestellt.

Tabelle 3-10: ^1H -NMR und ^{13}C -NMR Daten von *cyclo*-C3 α -dimethylallyl-D-Trp-D-Pro (**3c**) in CDCl_3 , *cyclo*-C3 β -dimethylallyl-L-Trp-L-Ala (**5c**), *cyclo*-C3 β -dimethylallyl-L-Trp-D-Ala (**6c**) und *cyclo*-C3 α -dimethylallyl-D-Trp-L-Ala (**8c**) in CD_3OH . Die Spektren wurden bei 500 bzw. 600 MHz aufgenommen.

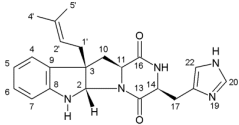
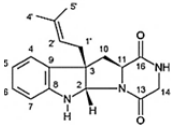
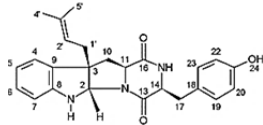
| | <i>cyclo</i> -C3 α - dimethylallyl-D-Trp- D-Pro (3c) | <i>cyclo</i> -C3 β - dimethylallyl-L-Trp-L-Ala (5c) | <i>cyclo</i> -C3 β - dimethylallyl-L-Trp-D-Ala (6c) | <i>cyclo</i> -C3 α - dimethylallyl-D-Trp-L- Ala (8c) | | |
|-----------------------------------|---|---|--|---|---------------------------|--|
| |  |  |  |  | | |
| Position | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{C} [ppm] | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{C} [ppm] | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) |
| NH-1 | - | - | - | - | - | - |
| H-2 | 5,41 s | 5,31 s | 80,4 | 5,37 s | 80,4 | 5,38 s |
| H-3 | - | - | 56,1 | - | e | - |
| H-4 | 7,07 m ^b | 7,10 br d (7,5) | 124,0 | 7,10 d (7,5) | 124,0 | 7,11 dd (7,5; 1,2) |
| H-5 | 6,75 td (7,6; 0,8) | 6,71 td (7,7; 0,9) | 119,6 | 6,70 td (7,5; 0,7) | 119,8 | 6,72 td (7,5; 1,0) |
| H-6 | 7,07 m ^b | 7,01 td (7,7; 1,2) | 129,3 | 7,02 td (7,5; 1,1) | 129,3 | 7,03 td (7,7; 1,3) |
| H-7 | 6,57 d (7,7) | 6,59 br d (7,8) | 109,9 | 6,59 d (7,6) | 110,2 | 6,60 dt (7,8; 0,6) |
| H-8 | - | - | 150,8 | - | e | - |
| H-9 | - | - | 132,0 | - | e | - |
| H-10 _{syn} ^a | 2,50 m | 2,57 dd (12,6; 6,3) | 40,5 | 2,60 dd (12,5; 6,1) | 39,6 | 2,61 dd (12,5; 6,1) |
| H-10 _{anti} ^a | 2,50 m | 2,23 dd (12,6; 11,3) | | 2,20 dd (12,3; 11,7) | | 2,22 dd (12,5; 11,5) |
| H-11 | 4,35 t (8,7) | 4,03 ddd (11,3; 6,2; 1,9) | 58,4 | 4,02 dd (11,4; 6,0) | 59,6 | 4,02 dd (11,5; 6,1) |
| H-13 | - | - | 168,7 | - | e | - |
| H-14 | 4,15 m | 4,11 qd (6,9; 1,8) | 53,9 | 3,90 m | 51,9 | 3,91 qd (7,2; 0,8) |
| NH-15 | - | 8,07 br s | - | 8,22 s | - | - |
| H-16 | - | - | 170,4 | - | e | - |
| H-17 | 3,46 m ^c | 1,36 d (6,9) | 19,9 | 1,36 d (7,1) | 15,6 | 1,36 d (7,1) |
| | 3,46 m ^c | | | | | |
| H-18 | 1,88-2,20 m ^d | - | - | - | - | - |
| | 1,88-2,20 m ^d | | | | | |
| H-19 | 1,88-2,20 m ^d | - | - | - | - | - |
| | 1,88-2,20 m ^d | | | | | |
| H-1' | 2,31 m | 2,39 dd 14,0, 7,0 2,44 dd (14,0; 8,1) | 36,8 | 2,41 dd (14,6; 7,4) 2,45 dd (14,5; 8,1) | 36,6 | 2,42 dd (14,4; 7,2) 2,46 dd (14,3; 7,9) |
| H-2' | 5,10 t (8,1) | 5,14 br t (7,3) | 119,7 | 5,13 br t (8,2) | 119,8 | 5,14 br t (7,9) |
| H-3' | - | - | 135,8 | - | e | - |
| H-4' | 1,62 s | 1,51 s | 17,5 | 1,52 s | 17,5 | 1,53 s |
| H-5' | 1,67 s | 1,66 s | 25,6 | 1,66 s | 25,6 | 1,67 s |

^a H-10_{syn} hat eine cis- und H-10_{anti} eine trans-Konfiguration zu H-11

^{b,c,d} Signale überlappen

^e aufgrund schwacher Intensität konnten die Signale nicht detektiert werden

Tabelle 3-11: ^1H -NMR und ^{13}C -NMR Daten von *cyclo*-C3 β -dimethylallyl-L-Trp-L-His (9c), *cyclo*-C3 β -dimethylallyl-L-Trp-Gly (10c) und *cyclo*-C3 β -dimethylallyl-L-Trp-L-Tyr (13c) in CD_3OH . Die Spektren wurden bei 500 bzw. 600 MHz aufgenommen.

| | <i>cyclo</i> -C3 β -dimethylallyl-L-Trp-L-His (9c) | | <i>cyclo</i> -C3 β -dimethylallyl-L-Trp-Gly (10c) | | <i>cyclo</i> -C3 β -dimethylallyl-L-Trp-L-Tyr (13c) | |
|-----------------------------------|---|---------------------------|---|---------------------------|---|---------------------------|
| |  | |  | |  | |
| Position | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{C} [ppm] | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{C} [ppm] | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{C} [ppm] |
| NH-1 | - | - | - | - | - | - |
| H-2 | 5,27 s | 80,5 | 5,34 s | 80,6 | 5,18 s | 80,3 |
| H-3 | - | 56,5 | - | 56,5 | - | 56,5 |
| H-4 | 7,09 br d (7,4) | 124,1 | 7,10 d (7,5) | 124,3 | 6,97 d (7,2) ^c | 124,2 |
| H-5 | 6,70 td (7,4; 0,9) | 119,8 | 6,70 td (7,5; 0,8) | 120,0 | 6,65 td (7,4; 0,8) | 119,6 |
| H-6 | 7,01 td (7,6; 1,2) | 129,4 | 7,01 td (7,6; 1,2) | 129,6 | 6,97 td (7,3; 1,2) ^c | 129,3 |
| H-7 | 6,57 d (7,7) | 110,0 | 6,58 d (7,6) | 110,2 | 6,52 d (7,5) | 109,5 |
| H-8 | - | 150,8 | - | 151,0 | - | 151,4 |
| H-9 | - | 132,0 | - | 132,4 | - | 131,5 |
| H-10 _{syn} ^a | 2,57 dd (12,6; 6,1) | 39,8 | 2,58 dd (12,5; 6,1) | 40,3 | 2,26 dd (12,1; 5,5) ^d | 41,8 |
| H-10 _{anti} ^a | 2,09 dd (12,5; 11,5) | | 2,22 dd (12,5; 11,5) | | 1,19 t (12,0) | |
| H-11 | 4,05 ddd (12,1; 6,1; 1,8) | 59,6 | 4,00 m | 59,2 | 3,79 ddd (12,0; 5,4; 1,7) | 58,7 |
| H-13 | - | 166,4 | - | 166,2 | - | 166,0 |
| H-14 | 4,45 td (6,0; 1,7) | 55,3 | 4,04 dd (17,1; 2,3) | 46,9 | 4,33 m | 57,7 |
| | - | - | 3,73 dd (17,0; 3,3) | | | |
| NH-15 | - | - | 8,01 s | - | 7,96 s | - |
| H-16 | - | 171,8 | - | 171,3 | - | 169,6 |
| H-17 | 3,19 dd (15,5; 5,7) | 26,0 | - | - | 3,16 dd (13,9; 4,1) | 38,3 |
| | 3,33 dd (4,3) ^b | | - | | 2,92 dd (13,9; 4,4) | |
| H-18 | - | 130,5 | - | - | - | 126,7 |
| H-19 | - | - | - | - | 7,01 d (8,5) ^e | 132,1 |
| H-20 | 8,75 s | 134,8 | - | - | 6,72 dt (8,5; 1,9) ^f | 116,0 |
| H-21 | - | - | - | - | - | 157,6 |
| H-22 | 7,32 s | 118,8 | - | - | 6,72 dt (8,5; 1,9) ^f | 116,0 |
| H-23 | - | - | - | - | 7,01 d (8,5) ^e | 132,1 |
| H-1' | 2,37 d (7,6) | 36,7 | 2,45 dd (14,5; 8,0) | 36,9 | 2,21 dd (14,3; 8,3) | 37,5 |
| | | | 2,41 dd (14,5; 7,3) | | 2,24 dd ^d | |
| H-2' | 5,10 br t (7,4) | 119,7 | 5,14 br t (7,2) | 120,0 | 4,84 m ^g | 119,8 |
| H-3' | - | 136,0 | - | 136,1 | - | 135,3 |
| H-4' | 1,49 s | 17,6 | 1,52 s | 17,8 | 1,51 s | 17,8 |
| H-5' | 1,65 s | 25,7 | 1,66 s | 25,9 | 1,61 s | 25,6 |

^a H-10_{syn} hat eine cis- und H-10_{anti} eine trans-Konfiguration zu H-11

^b Signale überlappen mit dem Lösungsmittels Signal

^{c,d,e,f} Signale überlappen ^g Signale überlappen mit dem Wasser Signal

In allen ^1H -NMR-Spektren der **c**-Reihe kann man eindeutig die Signale einer regulären Dimethylallyl-Einheit bei δ_{H} 2,21-2,46 (d oder dd, 2H-1'); 4,84-5,14 (br t, H-2'); 1,49-1,62 (s, 3H-4') und 1,61-1,67 (s, 3H-5') beobachten. Die Signale der beiden Protonen von H-1' der Prenyl-Einheit bei δ_{H} 2,21-2,46 ppm sprechen für eine Prenylierung an einem C- und nicht an einem O- oder N-Atom (Wollinsky *et al.*, 2012a; Yin *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2010a; Yin *et al.*, 2010b; Zou *et al.*, 2011). Im Vergleich zu den ^1H -NMR-Spektren der entsprechenden Substrate ist das Signal für H-2 bei den Produkten der **c**-Reihe von δ_{H} 7,2 zu 5,18-5,41 (s, 1H) ins Hochfeld verschoben. Diese Verschiebung ist ebenfalls bei revers C3-prenylierten Indolinen zu beobachten (Yin *et al.*, 2010a; Yin *et al.*, 2010b). Um die Prenylierungsposition zu bestätigen, wurden HMBC-Spektren von **6c**, **9c**, **10c** und **13c** aufgenommen (siehe Abbildung 3-9).

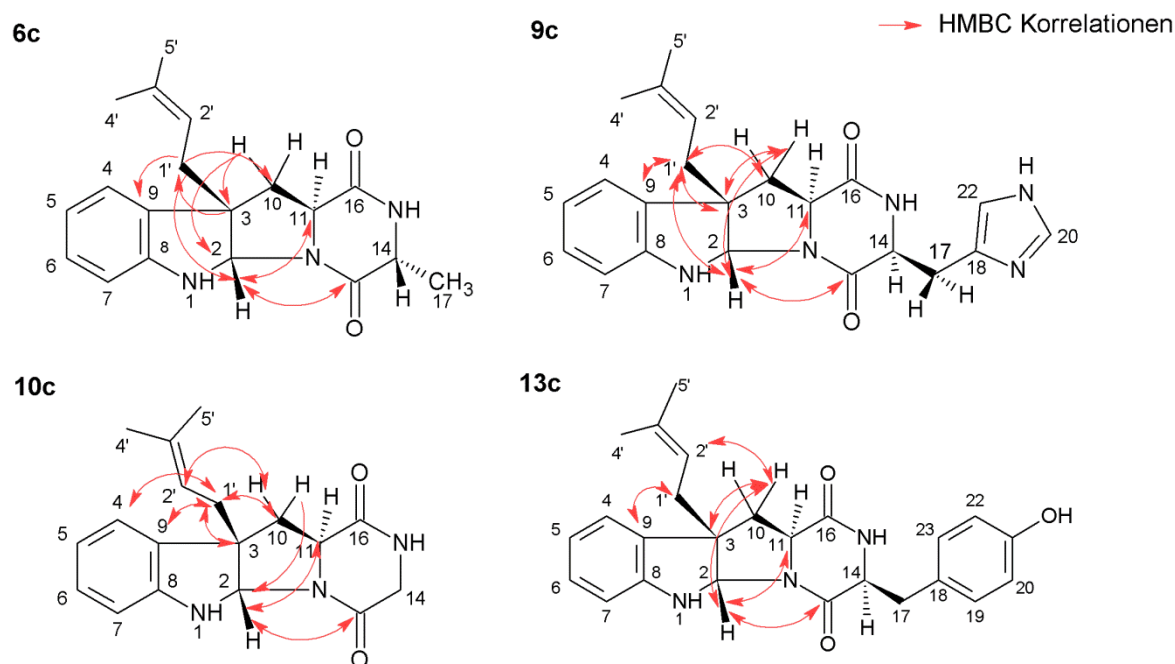


Abbildung 3-9: HMBC Korrelationen von **6c**, **9c**, **10c** und **13c**

Die Korrelationen in den HMBC-Spektren von H-1' der Prenyl-Einheit δ_{H} 2,21-2,46 ppm zu C-9 bei δ_{C} 131,5-132,4 ppm und zu C-3 δ_{C} 56,1-56,5 ppm bestätigten die Prenylierung an Position C-3. Zusätzlich dazu konnten in den HMBC-Spektren von **10c** und **13c** Korrelationen von H-10 zu C-2' beobachtet werden. Zur Überprüfung der Stereochemie der Prenyl-Einheit und H-2 wurden von **5c**, **6c**, **9c** und **13c** NOESY-Spektren aufgenommen. Die Korrelationen sind in folgender Abbildung 3-10 dargestellt.

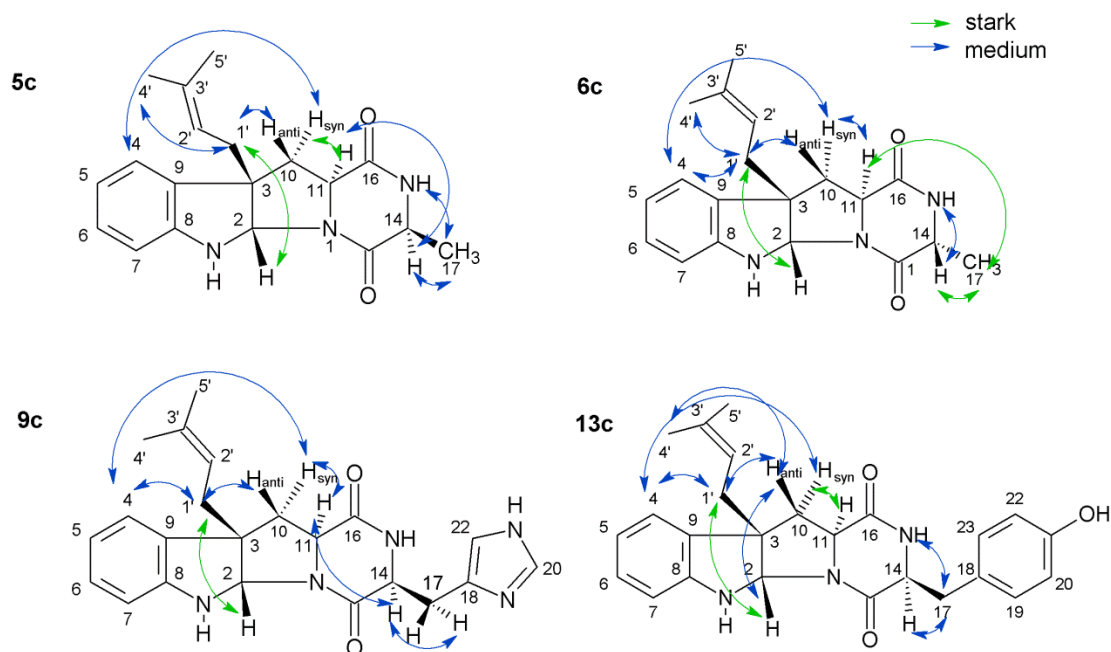
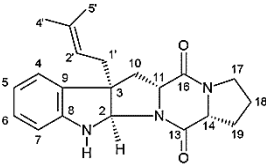
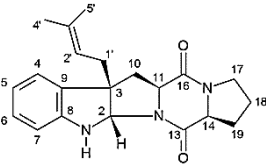
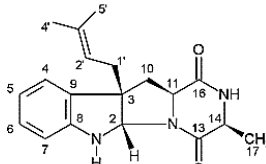


Abbildung 3-10: NOESY Korrelationen von 5c, 6c, 9c und 13c

In allen NOESY-Spektren waren Interaktionen zwischen H-10_{anti} und H-1', H-1' und H-2 sowie von H-10_{syn} zu H-4 zu beobachten. Die starke Interaktion von H-2 zu H-1' bestätigte die cis-Konfiguration zwischen H-2 und der Prenyl-Einheit an C-3 des Indolrings. Für alle analysierten Substanzen konnten außerdem starke NOESY Korrelationen zwischen H-11 und H-10_{syn} sowie von H-1' zu H-10_{anti} detektiert werden. Bei **13c** konnte zusätzlich eine Interaktion von H-10_{anti} zu H-2 beobachtet werden. Zusätzlich konnten keine Interaktionen zwischen H-11 und H-1' bzw. H-2' detektiert werden. Aus diesen Ergebnissen kann man schließlich ableiten, dass die Prenyl-Einheit der **c**-Reihe auf entgegengesetzter Seite von H-11, also als β -Konfiguration vorliegt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die aufgenommen ¹H-NMR-Spektren mit Daten aus der Literatur verglichen. So stimmte das ¹H-NMR-Spektrum von **5c** mit dem ¹H-NMR-Spektrum des synthetisch hergestellten *cyclo*-C3 β -dimethylallyl-L-Trp-L-Ala überein (Caballero *et al.*, 2003). Auch **3c** stimmte mit seinem synthetisch hergestellten Enantiomer *cyclo*-C3 β -dimethylallyl-L-Trp-L-Pro überein. Die beiden NMR Vergleiche sind in folgender Tabelle 3-12 dargestellt.

Tabelle 3-12: ^1H -NMR Daten von cyclo-C3 α -dimethylallyl-D-Trp-D-Pro (**3c**) in CDCl_3 und cyclo-C3 β -dimethylallyl-L-Trp-L-Ala (**5c**) in CD_3OH verglichen mit den Daten aus (Caballero *et al.*, 2003) in CDCl_3 . Die Spektren wurden bei 500 MHz aufgenommen.

| | cyclo-C3 α -dimethylallyl-D-Trp-D-Pro (3c) | cyclo-C3 β -dimethylallyl-L-Trp-L-Pro (Caballero <i>et al.</i> , 2003) | cyclo-C3 β -dimethylallyl-L-Trp-L-Ala (5c) | cyclo-C3 β -dimethylallyl-L-Trp-L-Ala (Caballero <i>et al.</i> , 2003) |
|-----------------------------------|---|---|---|--|
| |  |  | |  |
| Position | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) |
| H-2 | 5,41 s | 5,42 s | 5,31 s | 5,4 s |
| H-4 | 7,07 m ^b | 7,07 m ^a | 7,10 br d (7,5) | 7,06 m ^a |
| H-5 | 6,75 td (7,6, 0,8) | 6,75 td (7,4; 0,8) | 6,71 td (7,7; 0,9) | 6,73 td (7,4; 0,8) |
| H-6 | 7,07 m ^b | 7,07 m ^a | 7,01 td (7,7; 1,2) | 7,06 m ^a |
| H-7 | 6,57 d (7,7) | 6,58 d (7,7) | 6,59 br d (7,8) | 6,57 d (7,6) |
| H-10 _{syn} ^a | 2,50 m | 2,50 m ^b | 2,57 dd (12,6; 6,3) | 2,44 m ^b |
| H-10 _{anti} ^a | 2,50 m | 2,50 m ^b | 2,23 dd (12,6; 11,3) | 2,44 m ^b |
| H-11 | 4,35 t (9,7) | 4,36 t (8,6) | 4,03 ddd (11,3; 6,2; 1,9) | 4,08 q (7,0) |
| H-14 | 4,15 m | 4,14 m | 4,11 qd (6,9; 1,8) | 4,28 t (8,4) |
| NH-15 | - | - | 8,07 br s | - |
| H-17 | 3,46 m ^c 3,46 m ^c | 3,48 m ^c 3,48 m ^c | 1,36 d (6,9) | 1,44 d (7,0) |
| H-18 | 1,88- 2,20 m ^d 1,88- 2,20 m ^d | 2,22-187 m ^d 2,22-187 m ^d | - | - |
| H-19 | 1,88- 2,20 m ^d 1,88- 2,20 m ^d | 2,22-187 m ^d 2,22-187 m ^d | - | - |
| H-1' | 2,31 m | 2,32 m | 2,39 dd 14,0, 7,0 2,44 dd (14,0; 8,1) | 2,44 m ^b |
| H-2' | 5,10 t (8,1) | 5,10 t (7,9) | 5,14 br t (7,3) | 5,09 t (8,0) |
| H-4' | 1,62 s | 1,62 s | 1,51 s | 1,16 s |
| H-5' | 1,69 s | 1,69 s | 1,66 s | 1,69 s |

^a H-10_{syn} hat eine *cis* und H-10_{anti} eine *trans* Konfiguration zu H-11

^{b,c,d} Signale überlappen

Zusätzlich wiesen die beiden Enantiomere **6c** und **8c** die gleichen Signale im ^1H -NMR-Spektrum auf (siehe Abbildung 3-11).

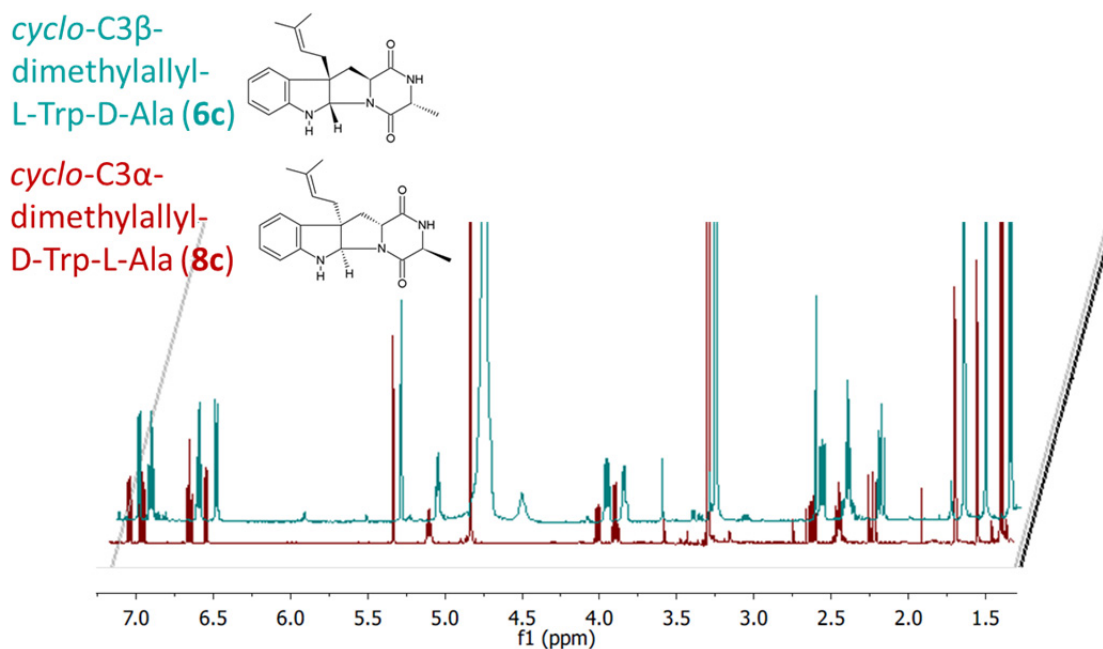


Abbildung 3-11: ^1H -NMR-Spektren von *cyclo*-C3 β -dimethylallyl-L-Trp-D-Ala (**6c**) und *cyclo*-C3 α -dimethylallyl-D-Trp-L-Ala (**8c**) im Vergleich

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass aus D-tryptophanhaltigen zyklischen Dipeptiden in der **c**-Reihe hexahydropyrrolo[2,3-*b*] Indole mit einer α -Konfiguration entstehen und aus L-tryptophanhaltigen zyklischen Dipeptiden in der **c**-Reihe hexahydropyrrolo[2,3-*b*] Indole mit einer β -Konfiguration. Die entsprechenden Strukturen der Produkte der **c**-Reihe sind in folgenden Abbildungen 3-12 und 3-13 dargestellt.

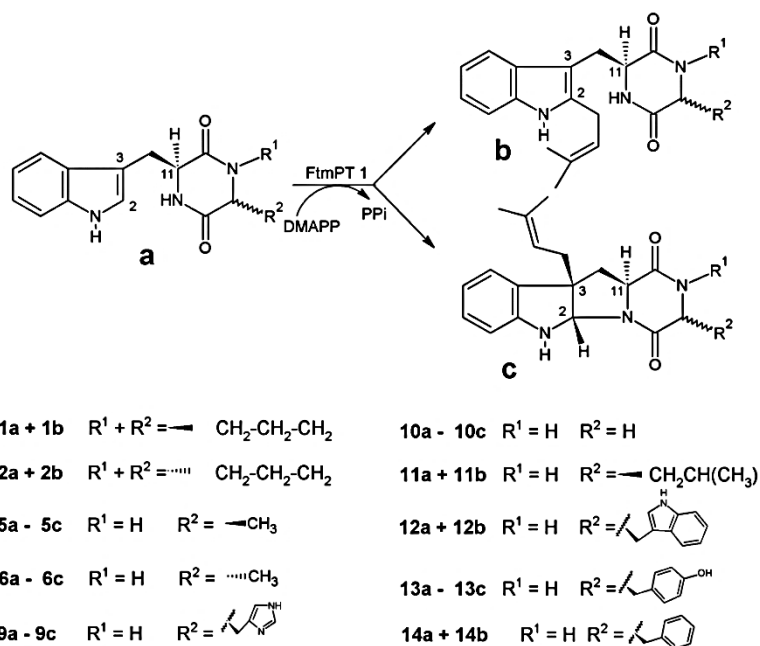


Abbildung 3-12: Umsatz von L-Tryptophan-haltigen zyklischen Dipeptiden mit FtmPT1 zu regulär C2- und C3 β -prenylierten Derivaten

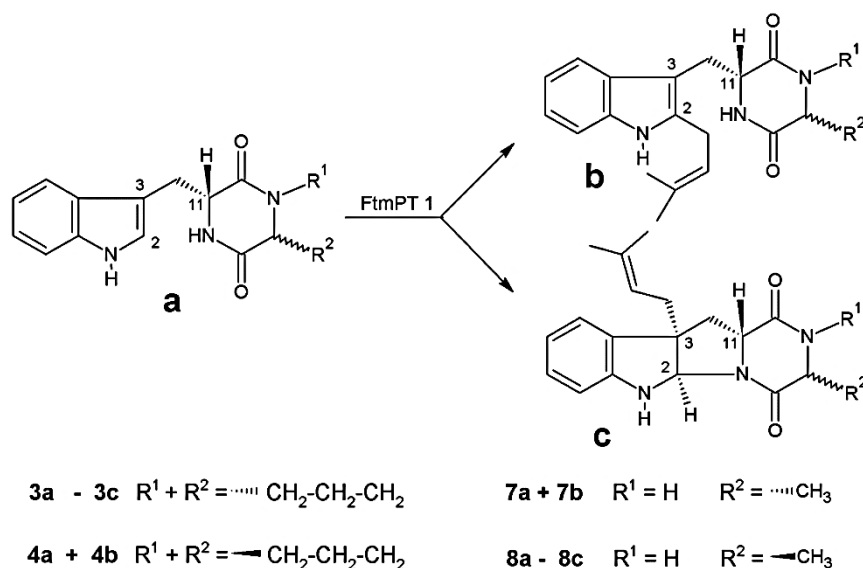


Abbildung 3-13: Umsatz von D-Tryptophan-haltigen zyklischen Dipeptiden mit FtmPT1 zu regulären C2- und C3α-prenylierten Derivaten

3.2.5.2. Strukturaufklärung der d-Reihe

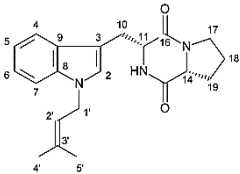
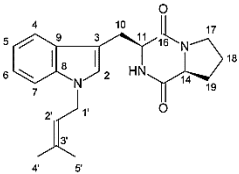
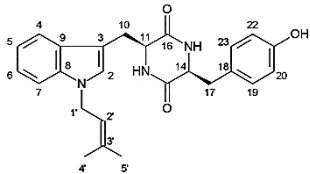
Zur Strukturaufklärung der **d**-Reihe wurden die Produkte **3d** und **13d** mittels semipräparativer HPLC (siehe 2.12.2.) isoliert und es wurden ^1H -NMR-Spektren und ESI-MS-Spektren aufgenommen, welche im Anhang unter 6.4. zu finden sind. Zusätzlich wurden HR-ESI-MS Messungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle 3-13 dargestellt.

Tabelle 3-13: HR-ESI-MS Daten der enzymatischen Produkte der d-Reihe

| Substanz | HR-ESI-MS Daten | | | |
|------------|--|-----------------------------------|----------|------------------|
| | Chemische Formel | berechnet | gemessen | Abweichung [ppm] |
| 3d | $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_2$ | 374,1844 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ | 374,1844 | 0,1 |
| 13d | $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_2$ | 440,1950 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ | 440,1999 | 1,9 |

Auch hier waren die $[\text{M}+\text{Na}]^+$ Ionen 68 Dalten größer als die der entsprechenden Substrate, so konnte ebenfalls eine Monoprenylierung der **d**-Reihe festgestellt werden. In der nachfolgenden Tabelle 3-14 sind die ^1H -NMR Daten von **3d** und **13d** dargestellt.

Tabelle 3-14: ^1H -NMR Daten von *cyclo*-N1-dimethylallyl-L-Trp-L-Tyr und *cyclo*-N1-dimethylallyl-D-Trp-D-Pro in CD_3OD verglichen mit den Daten aus (Yin *et al.*, 2007) aufgenommen in CDCl_3 . Die Spektren wurden bei 500 MHz aufgenommen.

| | <i>cyclo</i> -N1-dimethylallyl-D-Trp-D-Pro (3d) | <i>cyclo</i> -N1-dimethylallyl-L-Trp-L-Pro (Yin <i>et al.</i> , 2007) | <i>cyclo</i> -N1-dimethylallyl-L-Trp-L-Tyr (13d) | <i>cyclo</i> -N1-dimethylallyl-L-Trp-L-Tyr (Yin <i>et al.</i> , 2007) |
|----------|---|---|--|---|
| |  |  |  | |
| Position | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) |
| H-2 | 7,02 br s | 7,04 s | 6,98 s | 6,99 s |
| H-4 | 7,55 dt (8,0; 1,0) | 7,59 d (7,6) | 7,59 dt (8,0; 0,9) | 7,60 d (7,9) |
| H-5 | 7,01 ddd (8,0; 7,1; 1,0) | 7,10 m | 7,06 ddd (8,0; 7,0; 1,0) | 7,08 td (6,9; 1,0) |
| H-6 | 7,12 ddd (8,0; 7,1; 1,3) | 7,23 br t (7,6) | 7,16 ddd (8,0; 7,0; 1,0) | 7,17 td (6,9; 1,0) |
| H-7 | 7,29 dt (8,2; 0,8) | 7,40 d (8,5) | 7,32 dt (8,0; 0,8) | 7,32 d (8,2) |
| H-10 | 3,24 dd (14,6; 4,4) | 3,74 dd (15,1; 4,1) | 2,99 dd (14,6; 5,0) | 3,00 dd (14,8; 4,1) |
| | 2,87 dd (14,6; 3,2) | 2,95 m | 2,84 dd (14,6; 5,4) | 2,85 dd (14,8; 5,7) |
| H-11 | 3,96 ddd (10,9; 6,5; 2,0) | 4,39 br d (7,5) | 4,16 ddd (5,6; 4,3; 1,0) | 4,17 br t (5,4) |
| NH-12 | - | 6,37 s | - | - |
| H-14 | 4,38 tdd (4,7; 1,9; 0,8) | 4,01 dd (9,4; 7,2) | 3,82 ddd (8,8; 3,8; 1,0) | 3,82 dd (8,5; 3,6) |
| H-17 | 3,40 m | 3,49 m | 2,54 dd (13,2; 3,5) | 2,56 dd (13,5; 3,6) |
| | | 3,49 m | 1,35 dd (13,2; 8,8) | 1,36 dd (13,5; 8,0) |
| H-18 | 1,93 m | 1,92 m | - | - |
| | 0,93 m | | | |
| H-19 | 1,66 m | 2,30 m | 6,34 d (8,6) | 6,35 br d (8,2) |
| | 0,84 m | 2,08 m | | |
| H-20 | - | - | 6,57 d (8,6) | 6,58 br d (8,5) |
| H-22 | - | - | 6,57 d (8,6) | 6,58 br d (8,5) |
| H-23 | - | - | 6,34 d (8,6) | 6,35 br d (8,2) |
| H-1' | 4,68 d (7,0) | 4,67 d (7,0) | 4,70 d (6,8) | 4,70 d (6,9) |
| H-2' | 5,33 br t (7,0) | 5,37 br t (7,0) | 5,33 tt (6,9; 1,5) | 5,34 br t (6,9) |
| H-4' | 1,74 s | 1,77 s | 1,68 s | 1,69 s |
| H-5' | 1,83 s | 1,83 s | 1,82 s | 1,83 s |

Das ^1H -NMR-Spektrum von **13d** stimmte mit einer maximalen Abweichung von 0,02 ppm mit dem Spektrum von *cyclo*-N1-dimethylallyl-L-Trp-L-Tyr (Yin *et al.*, 2007) überein. **3d** hatte ein ähnliches NMR-Spektrum wie das Enantiomer *cyclo*-N1-dimethylallyl-L-Trp-L-Pro (Yin *et al.*, 2007). Somit handelte es sich bei der isolierten **d**-Reihe um N1-prenylierte Produkte.

3.2.6. Unabhängige Produktbildung der b-, c- und d-Reihen

Da im Reaktionsansatz mit FtmPT1 neben der erwarteten C2-Prenylierung auch C3- und N1-prenylierte Produkte isoliert werden konnten, wurde im Folgenden untersucht, ob diese Produkte unabhängig entstehen oder ineinander umgewandelt werden. Dafür wurden zunächst zeitabhängige Enzymassays mit **3a**, **6a**, **10a** und **13a** durchgeführt (siehe Abbildung 3-14).

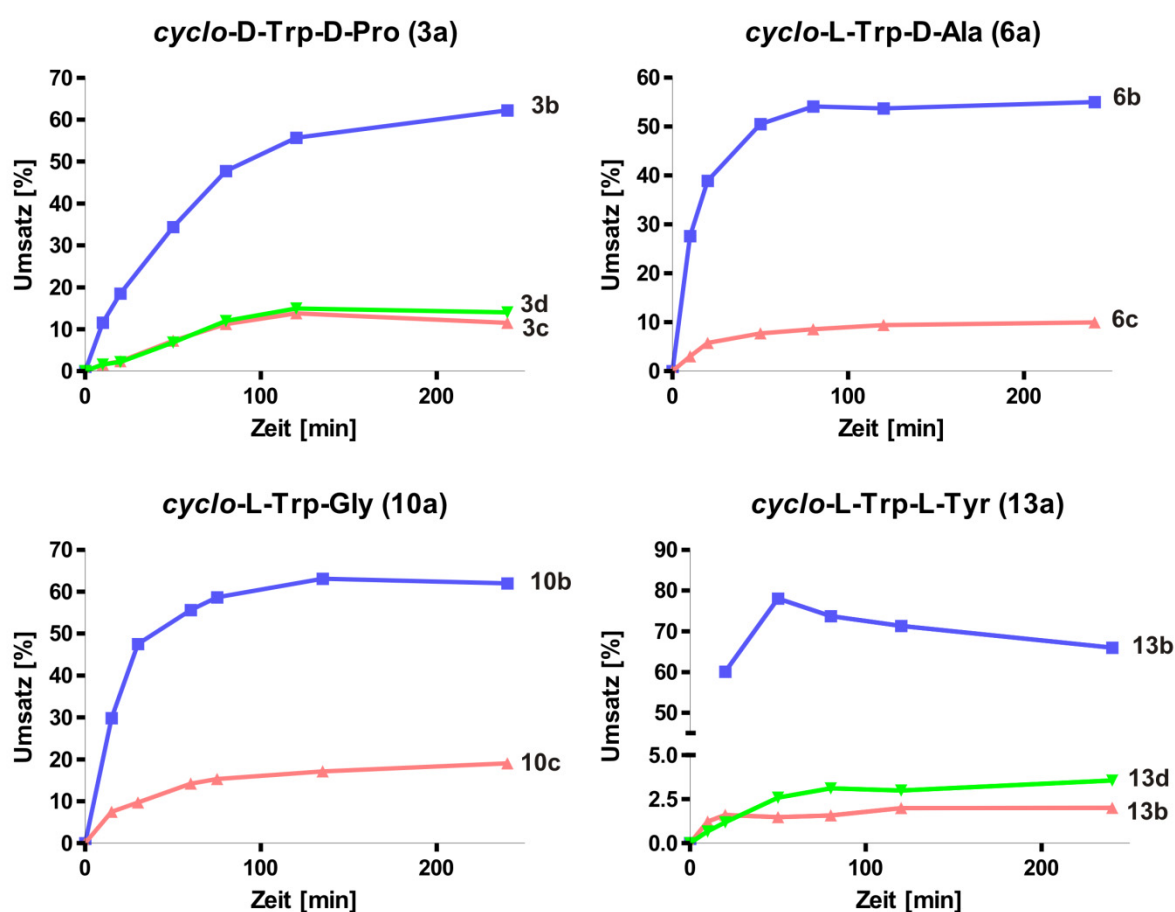


Abbildung 3-14: Zeitabhängigkeit von **3a**, **6a**, **10a** und **13a**

Wie man obiger Abbildung 3-14 entnehmen kann, ist der maximale Umsatz der **b**-Reihe von 60-80% nach ca. 1,5 h erreicht. Des Weiteren kann man erkennen, dass alle Produkte unabhängig voneinander gebildet werden und es zu keiner Umwandlung von einem Produkt in ein anderes kommt. Zusätzlich wurden isolierte Produkte der **b**-, **c**-, und **d**-Reihe von **5a**, **6a**, **8a**, **10a** und **13a** bei 37 °C für 2 h mit DMAPP und FtmPT1 bzw. ohne FtmPT1 inkubiert.

Als Positivkontrolle diente ein Ansatz mit den fünf Substraten und DMAPP sowie FtmPT1. Die Ergebnisse sind in folgender Abbildung 3-15 und 3-16 zusammengefasst.

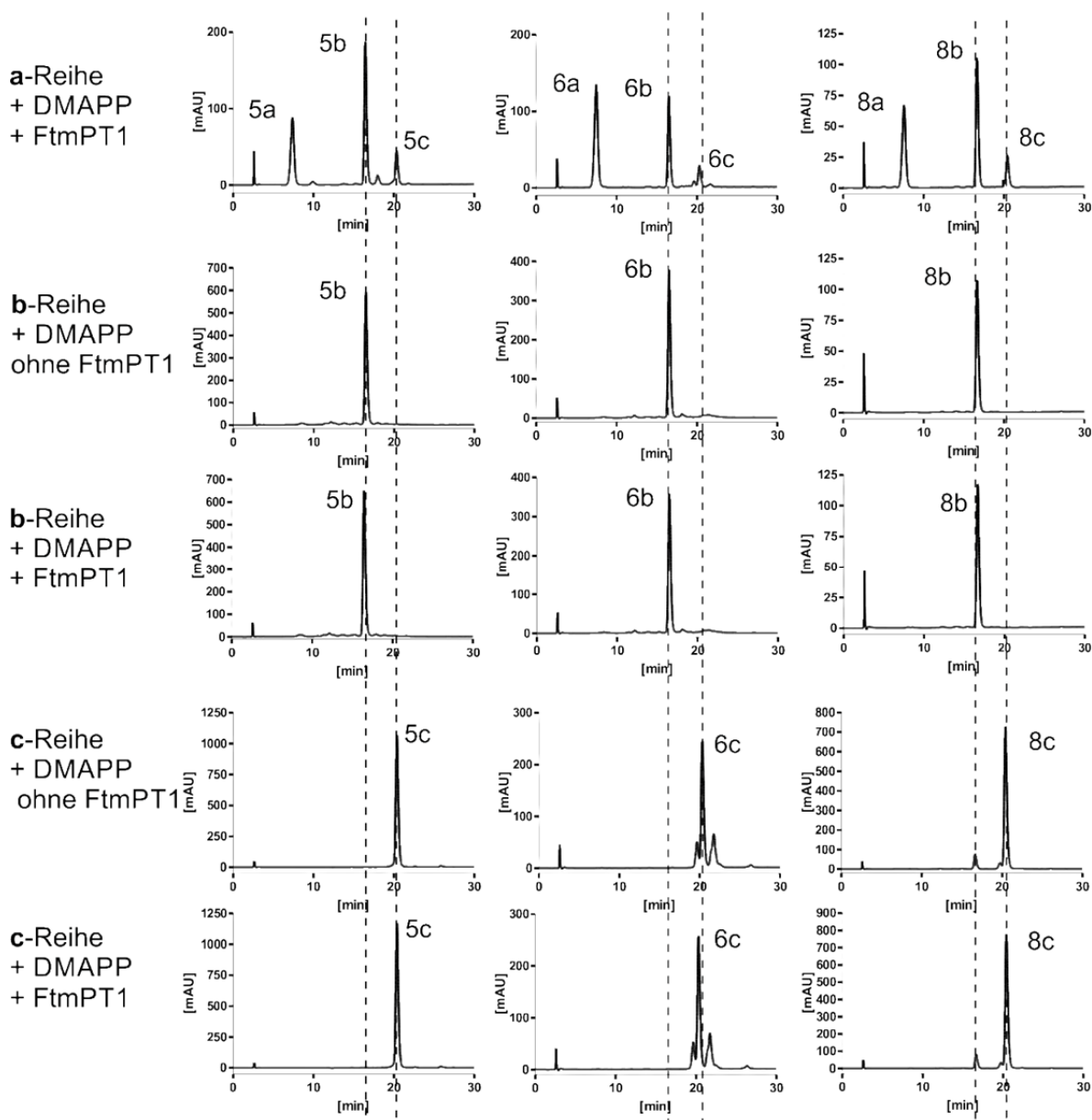


Abbildung 3-15: HPLC-Chromatogramme der Reaktionsansätze der b-, c- und d-Reihe von den Substraten 5a, 6a und 8a mit DMAPP und FtmPT1 bzw. ohne FtmPT1 bei 296 nm

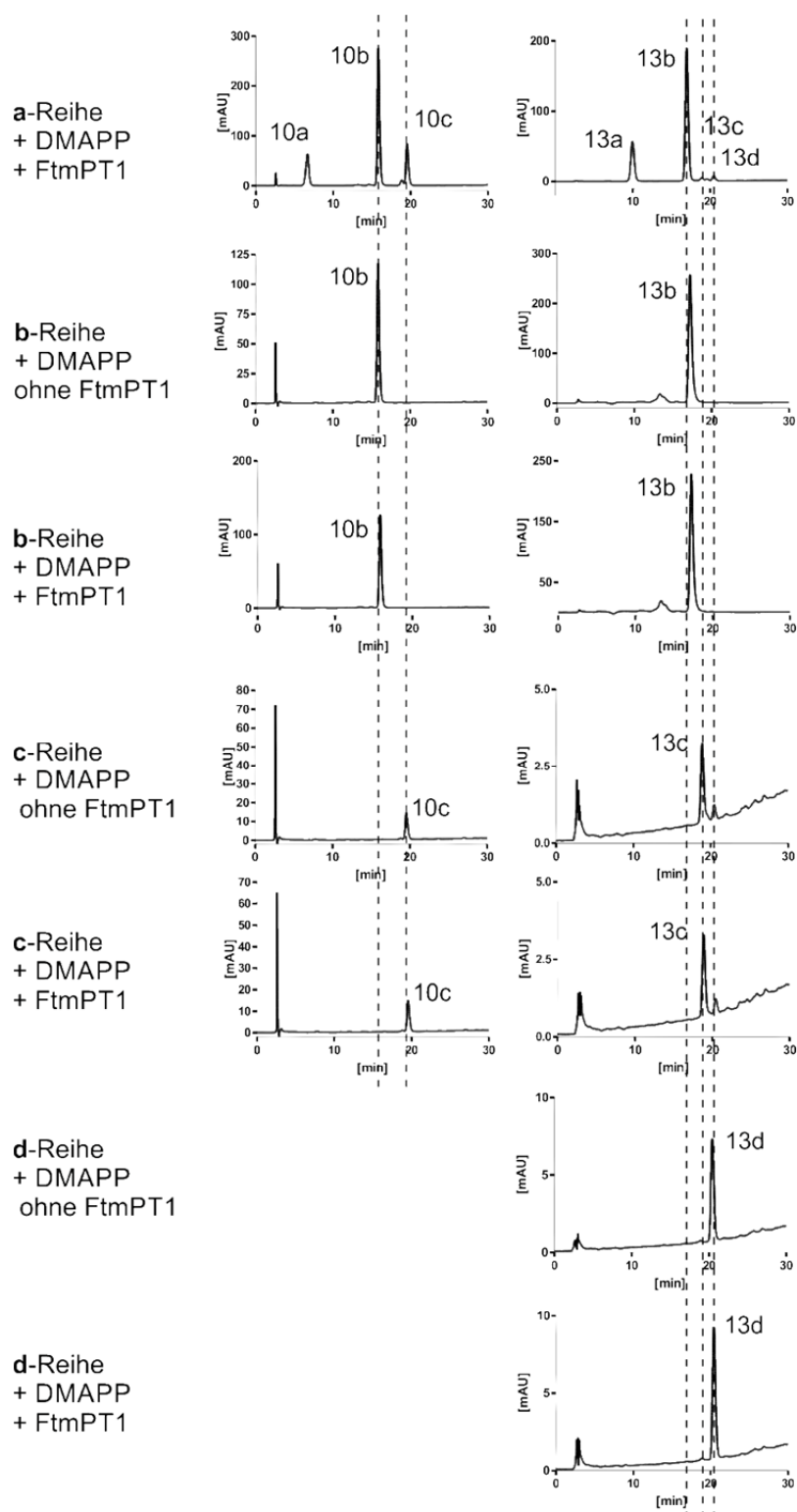


Abbildung 3-16: HPLC-Chromatogramme der Reaktionsansätze der b-, c- und d-Reihe von den Substraten 10a und 13a mit DMAPP und FtmPT1 bzw. ohne FtmPT1 bei 296 nm

Wie man obigen Abbildungen entnehmen kann, waren die Produkte der **b**-, **c**- und **d**-Reihe chemisch stabil und sie wurden in der Gegenwart von FtmPT1 und DMAPP nicht weiter umgesetzt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass eine Umwandlung der Reihen während der Bindung am Enzym stattfindet bevor sie FtmPT1 verlassen. Um besser zu verstehen, warum diese Produkte mit verschiedenen Prenylierungspositionen entstehen wurden im Folgenden für acht Substrate die kinetischen Parameter bestimmt. Die K_M -Werte sind in Tabelle 3-15 zusammengefasst und die dazugehörigen Graphen sind im Anhang unter 6.5. zu finden.

Tabelle 3-15: Kinetische Parameter für die b- und c-Reihe

| Substrat | K_M [mM] | | k_{cat} [s^{-1}] | | k_{cat}/K_M [$s^{-1}M^{-1}$] | |
|------------|------------|---------|------------------------|---------|----------------------------------|---------|
| | b-Reihe | c-Reihe | b-Reihe | c-Reihe | b-Reihe | c-Reihe |
| 1a | 0,16 | - | 4,05 | - | 25312 | - |
| 3a | 0,14 | - | 0,31 | - | 2214 | - |
| 5a | 0,54 | 0,48 | 1,47 | 0,13 | 2722 | 271 |
| 6a | 0,41 | - | 0,71 | - | 1732 | - |
| 8a | 0,39 | 0,14 | 0,24 | 0,06 | 615 | 429 |
| 9a | 0,45 | - | 2,14 | - | 4756 | - |
| 10a | 0,77 | 0,69 | 3,14 | 2,55 | 4078 | 3696 |
| 13a | 0,27 | 0,37 | 1,73 | 0,09 | 6407 | 246 |

-: nicht bestimmbar

Für die Substrate **3a**, **6a** und **9a** konnte für die Produkte der **c**-Reihe kein kinetischer Parameter ermittelt werden, da sich die Produktbildung unter den getesteten Bedingungen mit Substratkonzentrationen bis 2 mM noch im linearen Bereich befand. Bei den Substraten **6a** und **8a** hingegen kam es bei dieser Konzentration von 2 mM bereits zu einer Substrathemmung der **b**-Reihe. Die niedrigsten K_M -Werte von 0,14 bzw. 0,16 waren wie erwartet beim natürlichen Substrat **1a** und seinem Enantiomer **3a** zu finden.

3.3. Isolierung von Naturstoffen

3.3.1. Einleitung

Durch die Isolierung von verschiedenen Naturstoffen aus *P. commune* NRRL2033 und *N. fischeri* NRRL181 sollten im Folgenden die Biosynthesewege dieser Naturstoffe untersucht werden. Ziel war es unter anderem Fumigaclavin A aus *P. commune* NRRL2033 zu isolieren, da in der Arbeit von Dr. Marco Matuschek durch *in vitro* Versuche mit FgaOx₃_{PC} und FgaFS_{PC} mit dem Substrat Chanoclavin-I Aldehyd beide möglichen Produkte, Festuclavin und Pyroclavin gebildet wurden, sollte nun die tatsächliche *in vivo* Stereochemie von Fumigaclavin A festgelegt werden (siehe Einleitung unter 1.3.2.). Durch die Kultivierung von *N. fischeri* NRRL181 sollte unter anderem Fumitremorgin A, das vermutliche Endprodukt der Verruculogen Biosynthese, isoliert werden, um anschließend nach dem fehlenden Prenyltransferasegen im Genom von *N. fischeri* NRRL181 zu suchen. Zusätzlich sollten aber auch andere Alkaloide des Fumitremorgin-Typs wie Tryprostatine, Fumitremorgine, Cyclotryprostatine, Spirotryprostatine oder Verruculogene isoliert und mittels ESI-MS- und NMR-Spektroskopie charakterisiert werden, um im Anschluss deren Biosynthese zu untersuchen.

3.3.2. Isolierung von Fumigaclavin A aus *P. commune* NRRL2033

Zur Isolierung von Fumigaclavin A wurde *P. commune* NRRL2033 auf verschiedenen Medien als Submerskultur (CDH-, mCDH-, MEP-, PD- und HA-Medium) oder als Oberflächenkultur (Emerskultur) (Weizen- und Reis-Medium) und kultiviert. Die gewonnenen Kulturfiltratextrakte wurden zusätzlich mit 0,1 M HCl ausgeschüttelt, wie unter 2.11.1. beschrieben. In den Extrakten des CDH-, MEP-, PD und HA-Mediums konnte keine Produktion von Fumigaclavin A nachgewiesen werden. In den Extrakten des mCDH-, Weizen- und Reis-Mediums hingegen konnte Fumigaclavin A detektiert werden. Die HPLC-Chromatogrammen sind in folgender Abbildung 3-17 dargestellt.

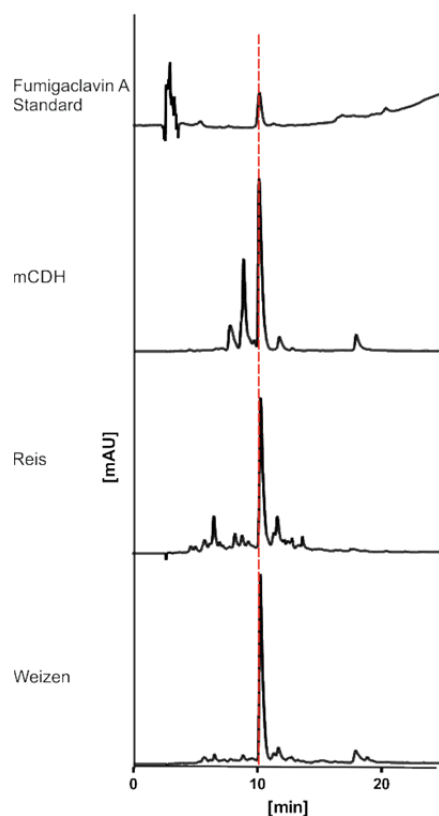
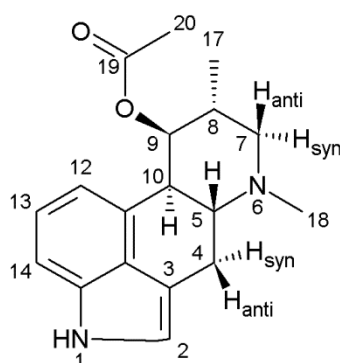


Abbildung 3-17: HPLC-Chromatogramme der Pilzextrakte des mCDH-, Weizen- und Reis-Mediums im Vergleich zum Standard Fumigaclavin A, detektiert bei 296 nm

Aus 100 g Reis- bzw. Weizen-Medium konnten je 5 mg Rohextrakt extrahiert werden, mit ca. 4 mg Fumigaclavin A. Pro 1000 ml mCDH-Medium wurden ca. 18 mg Fumigaclavin A produziert. Zur Analyse der Stereochemie von Fumigaclavin A wurde dieses aus dem Rohextrakt des Weizen-Mediums mittels semipräparativer HPLC isoliert (siehe 2.12.2.). Die ^1H - und ^{13}C -NMR Daten des isolierten Fumigaclavin A sind in folgender Tabelle 3-16 abgebildet.

Tabelle 3-16: ^1H -NMR Daten von Fumigaclavin A. Das Spektrum wurde bei 600 MHz in CD_3OD aufgenommen.

| Position | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{C} [ppm] |
|---------------------|---|---------------------------|
| H-2 | 7,07 d (1,3) | 120,69 |
| H-3 | - | 107,80 |
| H-4 _{anti} | 3,74 m | 25,15 |
| H-4 _{syn} | 3,03 ddd (1,2; 11,7; 12,9) | |
| H-5 _{anti} | 3,80 m | 64,16 |
| H-7 _{syn} | 3,49 d (13,0) | 58,25 |
| H-7 _{anti} | 3,66 dd (12,9; 4,0) | |
| H-8 _{anti} | 2,47 m | 33,26 |
| H-9 _{syn} | 5,78 br s | 69,89 |
| H-10 _{syn} | 3,73 m | 39,39 |
| H-11 | - | 126,91 |
| H-12 | 6,76 d (7,2) | 113,69 |
| H-13 | 7,10 t (7,7) | 123,89 |
| H-14 | 7,22 d (8,1) | 110,84 |
| H-15 | - | 135,72 |
| H-16 | - | 127,67 |
| H-17 | 1,41 d (7,6) | 15,40 |
| H-18 | 3,15 s | 42,42 |
| H-19 | - | 172,08 |
| H-20 | 1,88 s | 20,66 |

Die ^1H -NMR Daten wurden mit Werten aus der Literatur verglichen und stimmten mit maximaler Abweichung von 1,1 ppm, beruhend auf unterschiedlichen NMR-Lösungsmitteln, überein (Kawai *et al.*, 1992). Zusätzlich wurden HSQC-, HMBC- und NOESY-Spektren aufgenommen (siehe Anhang unter 6.6.). Die HMBC und NOESY Korrelationen sind in folgender Abbildung 3-18 dargestellt.

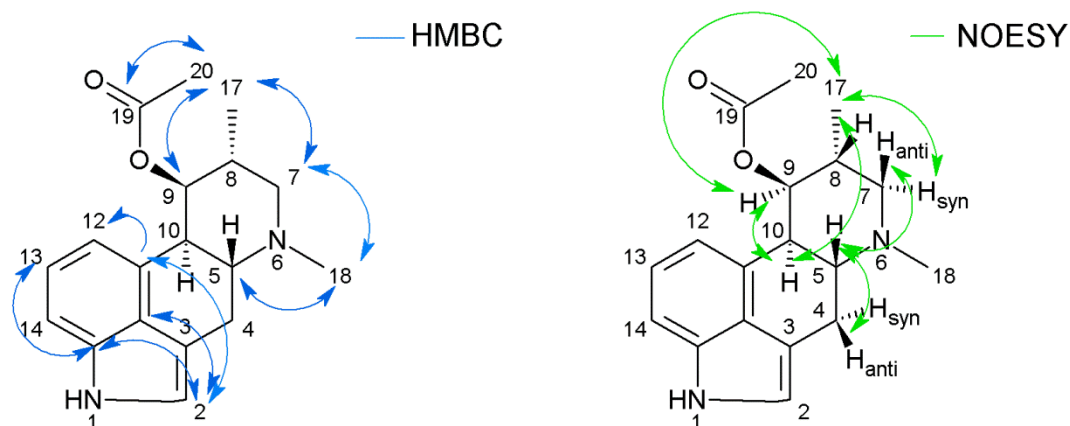


Abbildung 3-18: HMBC und NOESY Korrelationen von (8R,9S)-Fumigaclavin A

Durch die NOESY Korrelationen der Methylgruppe an C-8 mit $H_{10_{syn}}$ und $H_{7_{syn}}$ konnte man von einer Methylierung in α -Position ausgehen. Des Weiteren konnte zwischen H_{-8} und H_{-10} keine NOESY Korrelation beobachtet werden. Dafür korrelierte H_{-9} mit $H_{10_{syn}}$ und der Methylgruppe an C-8. Daraus lässt sich schließen, dass die Acetoxy-Gruppe in β -Position steht. Folglich konnte aus allen aufgenommen NMR-Spektren (1H -NMR-, HSQC-, HMBC- und NOESY-Spektren) die Stereochemie von Fumigaclavin A als (8R,9S)-Fumigaclavin A identifiziert werden.

3.3.3. Isolierung von Alkaloiden aus *N. fischeri* NRRL181

3.3.3.1. Screening von *N. fischeri* NRRL181

Aus dem Ascomyceten *N. fischeri* NRRL1881 sollten im Zuge dieser Arbeit verschiedene Sekundärmetabolite isoliert werden, um im Anschluss deren Biosynthese untersuchen zu können. Dafür wurde der Pilz zunächst im 100 ml Maßstab auf CDH-, mCDH-, MEP-, PD- und HA-Medium bei 25 °C bzw. 37 °C und 120 rpm bzw. ohne Schütteln (0 rpm) über 14 Tage, wie unter 2.6.3. beschrieben kultiviert. Die Aufreinigung und Extraktion der Naturstoffe aus den Kulturfiltraten und Mycelen erfolgte wie unter 2.11.2. beschrieben. Die erhaltenen Extrakte wurden in einer definierten Konzentration von 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in MeOH gelöst und die Analyse erfolgte, wie unter 2.12.1. dargestellt, mittels analytischer HPLC. Die HPLC-Chromatogramme der Pilzextrakte sind in folgender Abbildung 3-19 abgebildet.

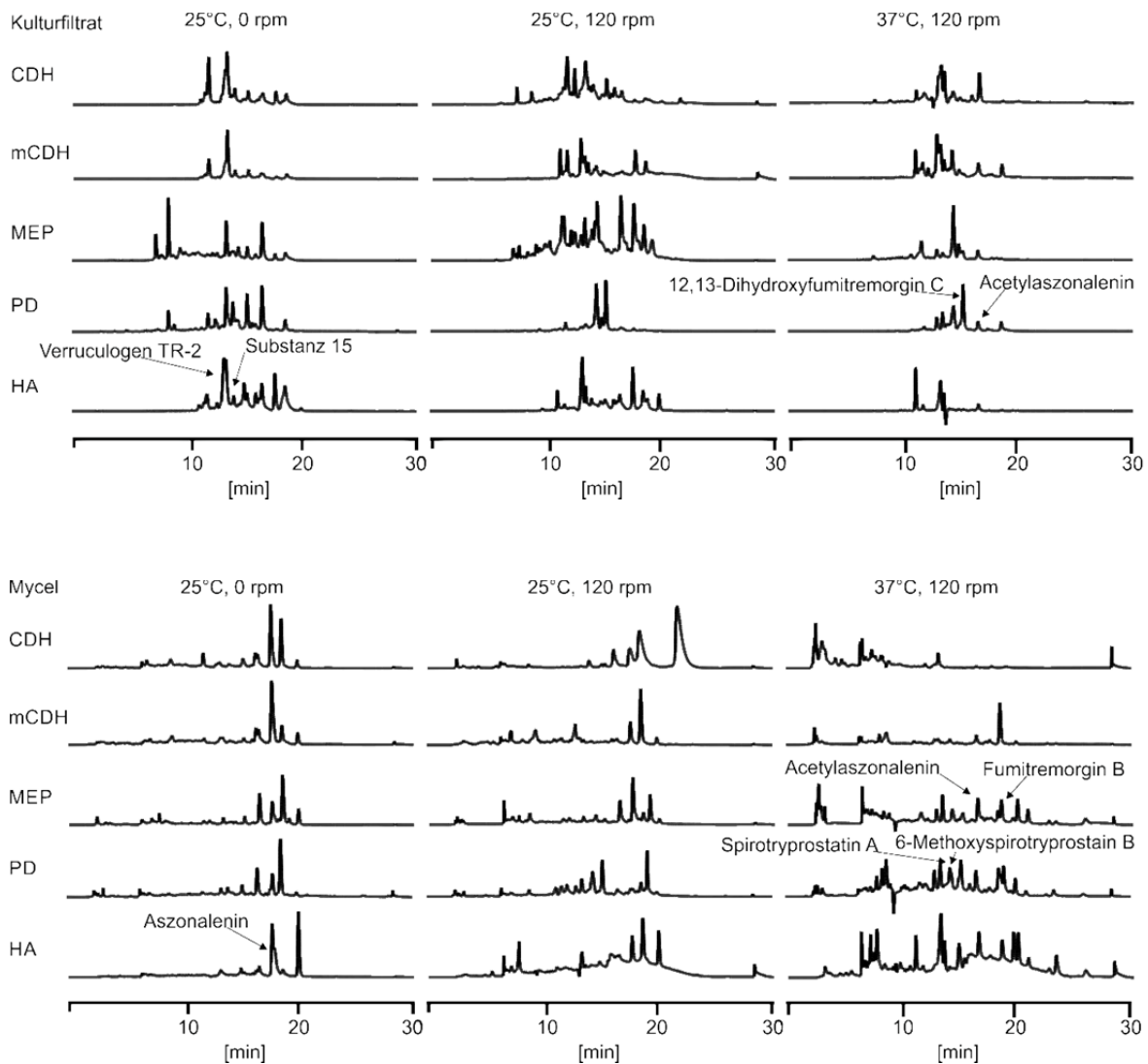


Abbildung 3-19: HPLC-Chromatogramme (296 nm) der Screening Extrakte von *N. fischeri* NRRL181. Die im Laufe dieser Arbeit isolierten Substanzen wurden mit Pfeilen markiert.

In den HPLC-Chromatogrammen der Extrakte konnte nicht nur ein deutlicher Unterschied zwischen den Temperaturen und den Medien, sondern auch zwischen dem Mycel und den Kulturfiltratextrakten beobachtet werden. Des Weiteren schien sogar die rpm Zahl einen Einfluss auf die Sekundärmetabolit-Produktion zu haben.

Um unter anderem Fumitremorgin A zu isolieren, wurden die Sekundärmetabolite der Pilzextrakte im Folgenden nach dem charakteristischen UV-Spektrum der Fumitremorgine untersucht. Dieses weist ein Maximum bei ca. 230 nm und zwei weitere Maxima bei 275 und 290 nm auf (siehe Abbildung 3-20).

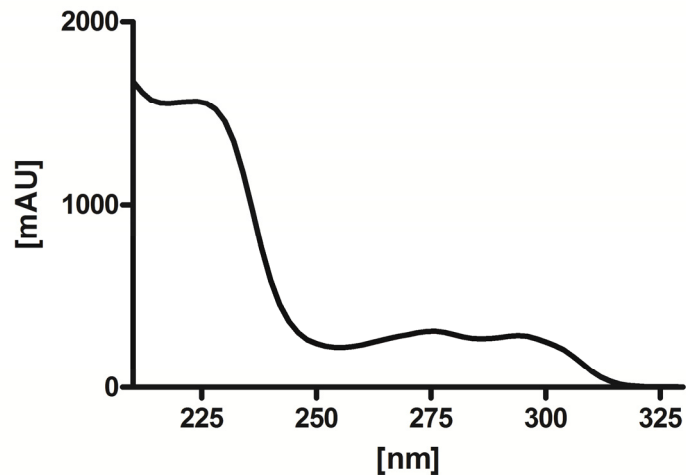


Abbildung 3-20: Charakteristisches UV-Spektrum der Fumitremorgine

Aufgrund dieser Maxima wurden alle HPLC-Chromatogramme der *N. fischeri* NRRL181 Extrakte bei 296 nm untersucht und analysiert. Betrachtet man die Kulturfiltratextrakte bei einer Wellenlänge von 254 nm sieht man meist einen Dominanten Acetylaszonalenin Peak. Als Beispiel ist in folgender Abbildung das HPLC-Chromatogramm des Kulturfiltrates des PD-Mediums bei 25 °C und 0 rpm abgebildet. Bei dieser Methode (siehe 2.12.1) beträgt die Retentionszeit von Acetylaszonalenin 16 min und das UV-Spektrum besitzt zwei Maxima bei 220 und 254 nm (siehe Abbildung 3-21).

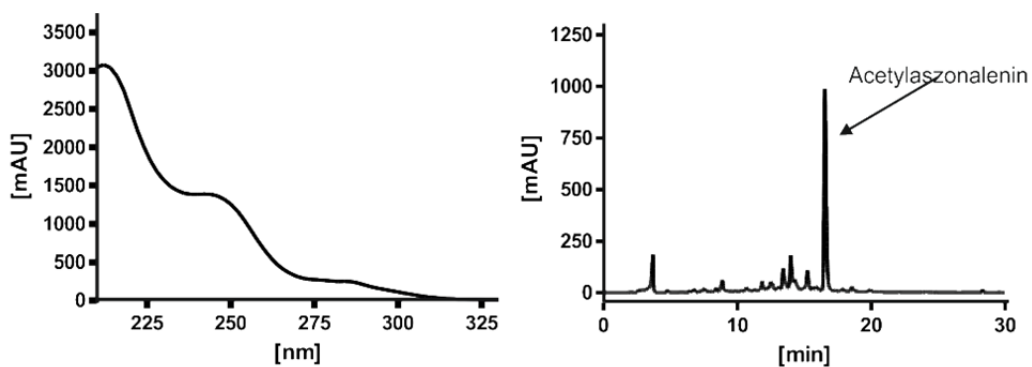


Abbildung 3-21: UV-Spektrum von Acetylaszonalenin und das HPLC-Chromatogramm (PD-Medium, KF, 25 °C, 0 rpm)

Des Weiteren wurde die Sekundärmetabolit-Produktion der verschiedenen Bedingungen untereinander verglichen. Auf diese Weise wurden drei Bedingungen (siehe Tabelle 3-17) ausgewählt, unter denen der Pilz im 4 l-Maßstab kultiviert werden sollte.

3.3.3.2. Fraktionierung an Kieselgel und Isolierung von Sekundärmetaboliten

Unter den ausgewählten Kultivierungsbedingungen, mit MEP- und PD-Medium als Submerskultur bei 37 °C und 120 rpm sowie mit HA-Medium bei 25 °C und 0 rpm, wurde der Pilz im Folgenden je Bedingung in vier 2000 ml Erlenmeyerkolben mit je 1000 ml Flüssigmedium für zwei Wochen kultiviert. Die Extraktion erfolgte wie unter 2.11.2 beschrieben und die erhaltenen Pilzextrakte wurden anschließend wie unter 2.11.2. erklärt über eine Kieselgelsäule chromatographiert, so dass für das Kulturfiltrat und das Mycel je acht Fraktionen erhalten wurden. Diese wurden wiederum mittels analytischer HPLC wie unter 2.12.1 beschrieben analysiert

Da die Arbeitsgruppe von Prof. Frisvad 1988 zeigen konnte, dass *N. fischeri* als Emerskultur auf mCDH-Medium unter Anderem Fumitremorgin A produziert, wurde der Ascomycet zusätzlich zu den bisher ausgewählten Submerskulturen auf mCDH-Medium als Emerskultur kultiviert (Nielsen *et al.*, 1988). Hierfür wurde der Pilz für zwei Wochen bei 25 °C und 0 rpm in zwei Fernbachkolben mit je 500 ml Festmedium kultiviert. Die Extraktion erfolgte im Fernbachkolben mit Ethylacetat das HPLC-Chromatogramm ist in folgender Abbildung 3-22 dargestellt.

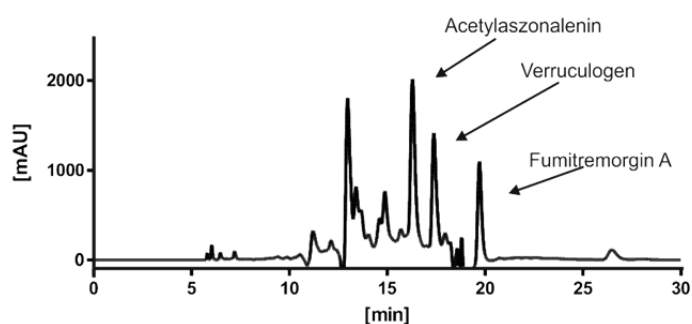


Abbildung 3-22: HPLC-Chromatogramm der Emerskultur auf mCDH-Medium bei 25 °C

Insgesamt wurden also vier Bedingungen ausgewählt. Zum besseren Überblick sind diese in folgender Tabelle 3-17 zusammengefasst.

Tabelle 3-17: Ausgewählte Kultivierungsbedingungen

| | Kultur | Medium | rpm | Temperatur |
|-------------|---------|--------|-----|------------|
| Bedingung 1 | Emers | mCDH | 0 | 25 °C |
| Bedingung 2 | Submers | MEP | 120 | 37 °C |
| Bedingung 3 | Submers | PD | 120 | 37 °C |
| Bedingung 4 | Submers | HA | 0 | 25 °C |

3.3.3.3. Isolierung und Strukturaufklärung von Fumitremorgin A, Acetylaszonalenin und Verruculogen aus der Kultivierungsbedingung 1 (Emerskultur, mCDH-Medium, 25 °C, 0 rpm)

Das Extrakt der Kulturbedingung 1 wurde wie unter 2.11.2. beschrieben an Kieselgel chromatographiert und in folgender Abbildung 3-23 sind die HPLC-Chromatogramme der erhaltenen Kieselgelfractionen dargestellt.

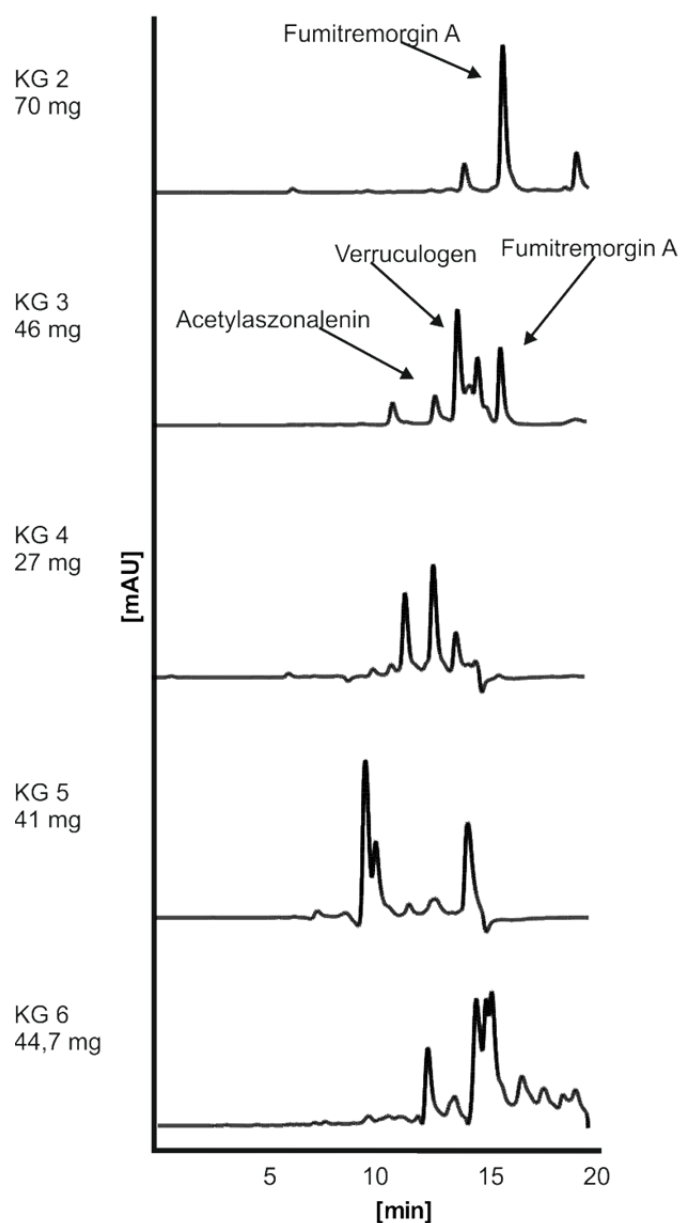


Abbildung 3-23: HPLC-Chromatogramme der Kieselgelfractionen (KG 2-KG 6), mCDH-Medium, 25 °C, 0 rpm

Die erhaltenen Fraktionen wurden im Folgenden bezüglich der Auftrennung, Menge und UV-Spektren untersucht. So wurden die Kieselgelfractionen 2 und 3 (KG 2+KG 3) des

Kulturfiltrates für weitere Analysen mittels semipräparativer HPLC ausgewählt. Das Flussdiagramm ist in folgender Abbildung 3-24 dargestellt.

mCDH-Medium, 2 Wochen, 25°C, 0 rpm, 1000 ml Emerskultur

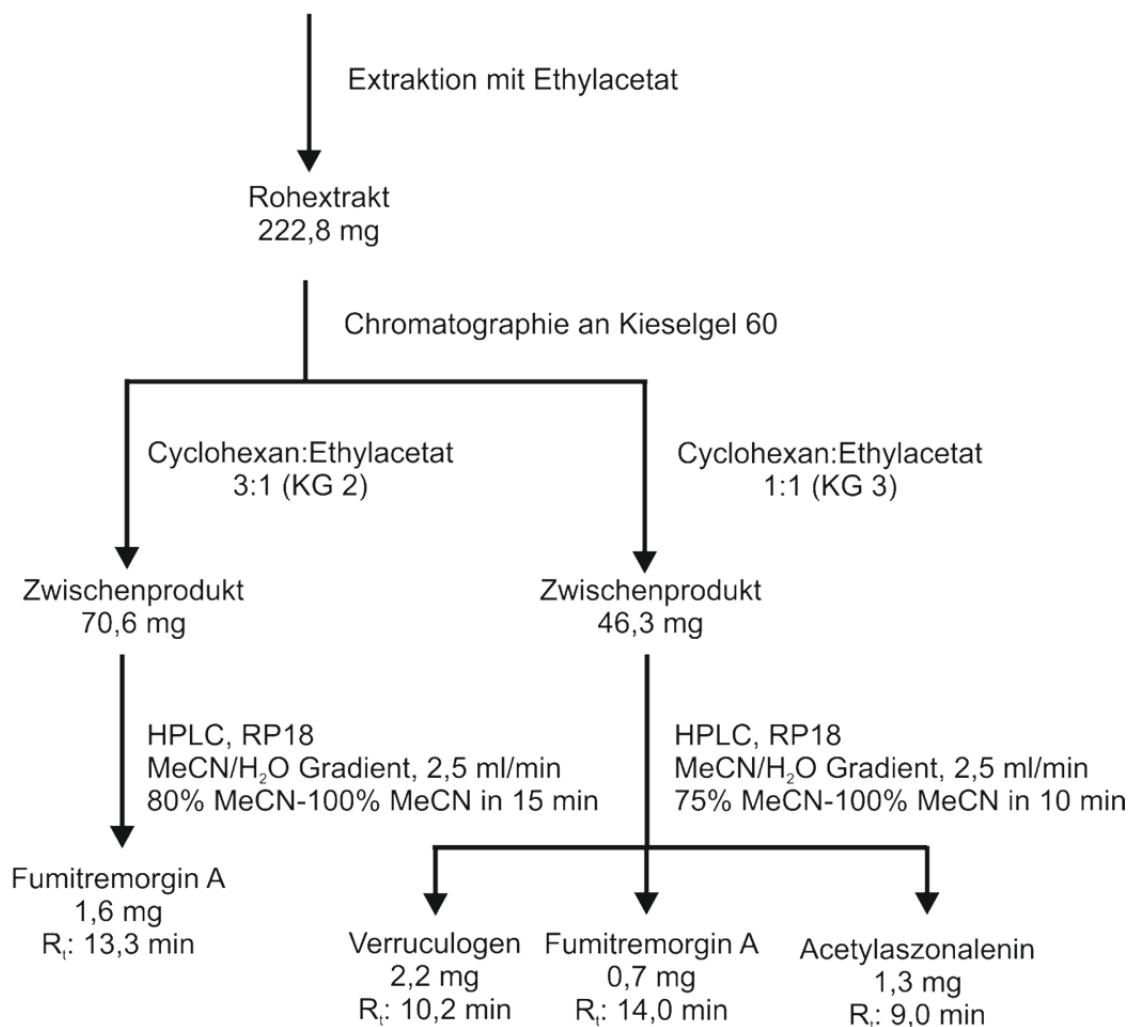
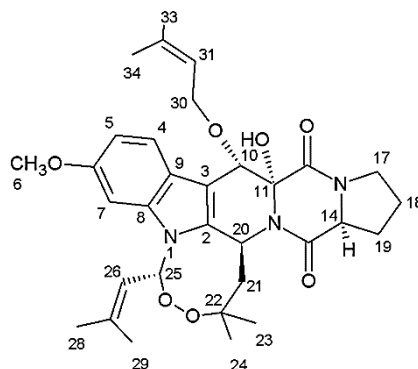


Abbildung 3-24: Flussdiagramm, Emerskultur, mCDH-Medium, 25 °C, 0 rpm

Zur Strukturaufklärung wurden von den isolierten Verbindungen ESI-MS und ¹H-NMR-Spektren aufgenommen (siehe Anhang unter 6.7.). Die erhaltenen Daten wurden im Folgenden mit Daten aus der Literatur verglichen. Auf diese Weise konnten insgesamt drei der isolierten Verbindungen identifiziert werden, unter anderem Fumitremorgin A (2,3 mg) aus den Kieselgelfractionen 2 und 3 (KG 2+KG 3). In folgender Tabelle 3-18 sind die NMR Daten von Fumitremorgin A dargestellt, welche mit den Daten aus der Literatur von Yamazaki et al. von 1980 verglichen wurden.

Tabelle 3-18: ^1H -NMR Daten des isolierten Fumitremorgin A, verglichen mit (Yamazaki *et al.*, 1980). Beide Spektren wurden bei 500 MHz in CDCl_3 aufgenommen



| Position | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (Yamazaki <i>et al.</i> , 1980) | Position | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (Yamazaki <i>et al.</i> , 1980) |
|----------|--|---|------------------|--|---|
| H-4 | 7,67 d (8,7) | 7,68 d | H-24 | 1,98 s | 0,99 s oder 2,00 s |
| H-5 | 6,82 dd (8,7; 2,2) | 6,82 q | H-25 | 6,62 d (8,0) | 6,62 d |
| H-7 | 6,59 d (2,2) | 6,59 d | H-26 | 5,01 dt (8,1, 1,3) | 5,02 br d |
| H-10 | 5,49 brs | 5,50 s | H-28 | 1,70 s oder 1,70 s | 1,71 s |
| H-11 | 4,46 s | 4,48 s | H-29 | 1,71 s oder 1,71 s | 1,71 s |
| H-14 | 5,06 dd (10,9; 7,0) | 5,06 t | H-30 | 4,66 dd (9,3; 7,5) | 4,71 br q |
| H-17 | 3,62 m | 3,63 m | | 4,71 dd (11,2; 7,1) | |
| H-18 | 1,6-2,4 m | 1,6-2,2 + 2,4 | H-31 | 5,59 tt (6,9; 1,4) | 5,60 br t |
| H-19 | 1,6-2,4 m | 1,6-2,2 + 2,4 | H-33 | 1,80 s | 1,81 s |
| H-20 | 6,12 d (10,0) | 6,13 br d | H-34 | 1,80 s | 1,81 s |
| H-21 | 1,6-2,4 m | 1,6-2,2 + 2,40 | OCH ₃ | 3,84 s | 3,84 s |
| H-23 | 0,99 s | 0,99 s oder 2,00 s | | | |

In diesem NMR-Spektrum konnten sechs charakteristische Methylgruppen bei δ_{H} 1,98; 1,80; 0,99; 1,71 und 1,70 ppm, welche drei regulären Prenylierungen an N-1, C-2 und OH-10 zugeordnet werden konnten, detektiert werden. Ein weiteres deutliches Signal bildete die Methoxygruppe mit einem Singulett bei δ_{H} 3,84 ppm. Die drei Protonen im aromatischen Bereich bei δ_{H} 6,59; 6,82 und 7,76 ppm wiesen auf eine Substanz mit einem Indol Grundkörper hin. Tatsächlich stimmte das ^1H -NMR-Spektrum mit einer maximalen Abweichung von 0,02 ppm mit den Daten aus der Literatur von Fumitremorgin A überein (Yamazaki *et al.*, 1980). Im ESI-MS-Spektrum konnte neben der Masse von Fumitremorgin A ($[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 580$ und $[\text{M}+\text{Na}]^+ m/z = 602$) auch ein Peak bei $m/z = 494$ detektiert werden, hierbei handelte es sich um Fumitremorgin A bei dem die instabile Sauerstoff-Bindung zwischen den beiden Prenylgruppen von NH-1 und C-2 geöffnet und die OH-Prenylierung abgespalten wurde.

Neben Fumitremorgin A konnten auch 2,2 mg Verruculogen aus der Kieselgelfraktion 3 (KG 3) isoliert werden. Die ^1H -NMR Daten sind in folgender Tabelle 3-19 dargestellt.

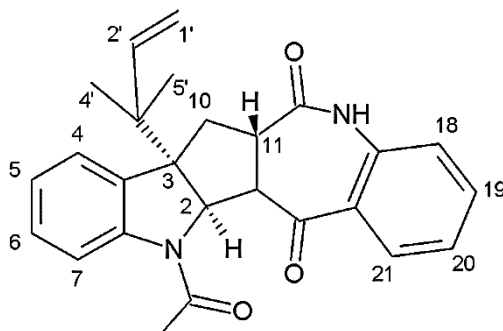
Tabelle 3-19: ^1H -NMR Daten des isolierten Verruculogens, verglichen mit einem Spektrum aus der Literatur (Ciegler A. *et al.*, 1976). Beide Spektren wurden bei 500 MHz in CDCl_3 aufgenommen.

| Position | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (Ciegler A. et al., 1976) | Position | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (Ciegler A. et al., 1976) |
|----------|--|--|------------------|--|---|
| H-4 | 7,89 d (8,7) | 7,89 d | H-19 | 2,02 m | 1,6-2,1 |
| H-5 | 6,82 dd (8,7; 2,2) | 6,82 dd | | 1,68 dd (13,4; 10,0) | |
| H-7 | 6,59 d (2,2) | 6,59 d | H-20 | 6,05 d (10,1) | 6,04 d |
| H-10 | 5,65 br s | 5,65 s | H-21 | 2,52 m | 2,51 m |
| OH-10 | 4,75 br s | | H-23 | 1,01 s | 1,01 s |
| OH-11 | 4,00 br s | 4,01 br s | H-24 | 2,00 s | 2,00 s |
| H-14 | 4,48 dd (9,9; 7,1) | 4,48 dd | H-25 | 6,64 d (8,1) | 6,64 d |
| H-17 | 3,64 m | 3,64 m | H-26 | 5,04 dt (8,2; 1,1) | 5,04 d |
| H-18 | 2,02 m | 1,6-2,1 | H-28 | 1,72 s oder 1,72 s | 1,72 s oder 1,72 s |
| | 1,68 dd (13,4; 10,0) | | H-29 | 1,74 s oder 1,74 s | 1,73 s oder 1,73 s |
| | | | OCH ₃ | 3,84 s | 3,84 s |

Auch hier konnte wieder eine Methoxygruppe mit einem deutlichen Singulett bei δ_{H} 3,84 ppm detektiert werden. Im Gegensatz zu Fumitremorgin A wurden in diesem Spektrum nur vier Methylgruppen bei δ_{H} 2,0; 1,74; 1,72 und 1,01 ppm beobachtet, was in diesem Falle für eine zweifache Prenylierung sprach. Auch die Aromaten des Indolringes und die Protonen des Prolinrestes waren gut zu erkennen. Der Vergleich mit den Daten aus der Literatur zeigte, dass die Spektren bis auf eine maximale Abweichung von 0,01 ppm mit dem ^1H -NMR-Spektrum von Verruculogen übereinstimmten (Ciegler A. *et al.*, 1976). Im ESI-MS-Spektrum konnte man neben der Masse von Verruculogen ($[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 534$) wieder ein Peak bei $m/z = 494$ erkennen, hierbei handelte es sich um Verruculogen, bei dem die instabile Sauerstoff-Bindung zwischen den beiden Prenylgruppen geöffnet vorlag.

Als dritte Substanz konnte unter dieser Bedingung Acetylaszonalenin isoliert und identifiziert werden. Hiervon wurden insgesamt 1,3 mg aus der Kieselgelfraktion 3 (KG 3) isoliert. In der folgenden Tabelle 3-20 sind die ^1H -NMR Daten abgebildet.

Tabelle 3-20: ^1H -NMR Daten des isolierten Acetylaszonalenins, verglichen mit (Yin *et al.*, 2009b). Beide Spektren wurden bei 500 MHz in CDCl_3 aufgenommen.



| Position | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} multi. (J [Hz]) (Yin <i>et al.</i> , 2009b) | Position | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} multi. (J [Hz]) (Yin <i>et al.</i> , 2009b) |
|----------|--|--|-------------------|--|---|
| H-2 | 5,92 s | 5,93 s | H-19 | 7,07 td (7,5; 1,1) | 7,07 td (7,6; 0,8) |
| H-4 | 6,85 dd (8,1; 0,4) | 6,87 d (8,4) | H-20 | 7,28 dd (7,9; 1,2) | 7,28 td (7,3; 1,3) |
| H-5 | 7,40 td (7,8; 0 1,6) | 7,40 td (7,9; 1,3) | H-21 | 8,00 d (8,0) | 8,00 d (7,9) |
| H-6 | 7,18 t (7,8) | 7,18 t (7,4) | H-1' | 5,11 d (11,4) | 5,14 d (10,4) |
| H-7 | 7,70 dd (7,9; 1,4) | 7,70 dd (7,9; 1,3) | | 5,14 d (4,6) | 5,13 d (17,4) |
| H-10 | 3,36 dd (13,8; 8,5) | 3,37 dd (13,5; 8,5) | H-2' | 5,89 dd (17,3; 10,9) | 5,89 dd (17,4; 10,4) |
| | 2,44 dd (13,8; 8,4) | 2,44 dd (13,8; 8,2) | H-4' | 0,98 s | 0,99 s |
| H-11 | 3,89 t (8,4) | 3,90 t (8,4) | H-5' | 1,18 s | 1,19 s |
| NH-16 | 7,46 br s | 7,75 s | COCH ₃ | 2,59 s | 2,59 s |
| H-18 | 7,22 d (7,4) | 7,23 d (7,3) | | | |

In diesem Spektrum konnten deutliche Signale einer reversen Prenylierung mit ihren zwei Methylgruppen bei δ_{H} 1,18 und 0,98 ppm, den zwei Dupletts bei δ_{H} 5,11 und 5,14 ppm und dem Duplett vom Duplett bei δ_{H} 5,89 ppm detektiert werden. Die Acetylgruppe wies ein deutliches Singulett mit drei Protonen bei δ_{H} 2,59 ppm auf. Insgesamt konnten acht aromatische Signale beobachtet werden, wobei je vier miteinander koppelten. Schließlich wurde das Spektrum mit Daten aus der Literatur verglichen und zeigte dabei eine maximale Differenz von 0,02 ppm mit dem ^1H -NMR-Spektrum von Acetylaszonalenin auf (Yin *et al.*, 2009b). Die Struktur wurde zusätzlich durch die Detektion des $[\text{M}+\text{H}]^+$ Ions bei $m/z = 416$, des $[\text{M}+\text{Na}]^+$ Ions bei $m/z = 438$ und des $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ Ions bei $m/z = 853$ im positiven ESI-MS-Spektrum bestätigt (siehe Anhang unter 6.7.3.)

3.3.3.4. Isolierung und Strukturaufklärung von Acetylaszonalenin und Fumitremorgin B aus der Kultivierungsbedingung 2 (Emerskultur, MEP-Medium, 37 °C, 120 rpm)

Die erhaltenen Kulturfiltrat und Mycel Extrakte der Kultivierungsbedingung 2 wurden ebenfalls über Kieselgel chromatographiert. In folgender Abbildung 3-25 sind die HPLC-Chromatogramme der gewonnenen Kieselgelfractionen (KG) abgebildet.

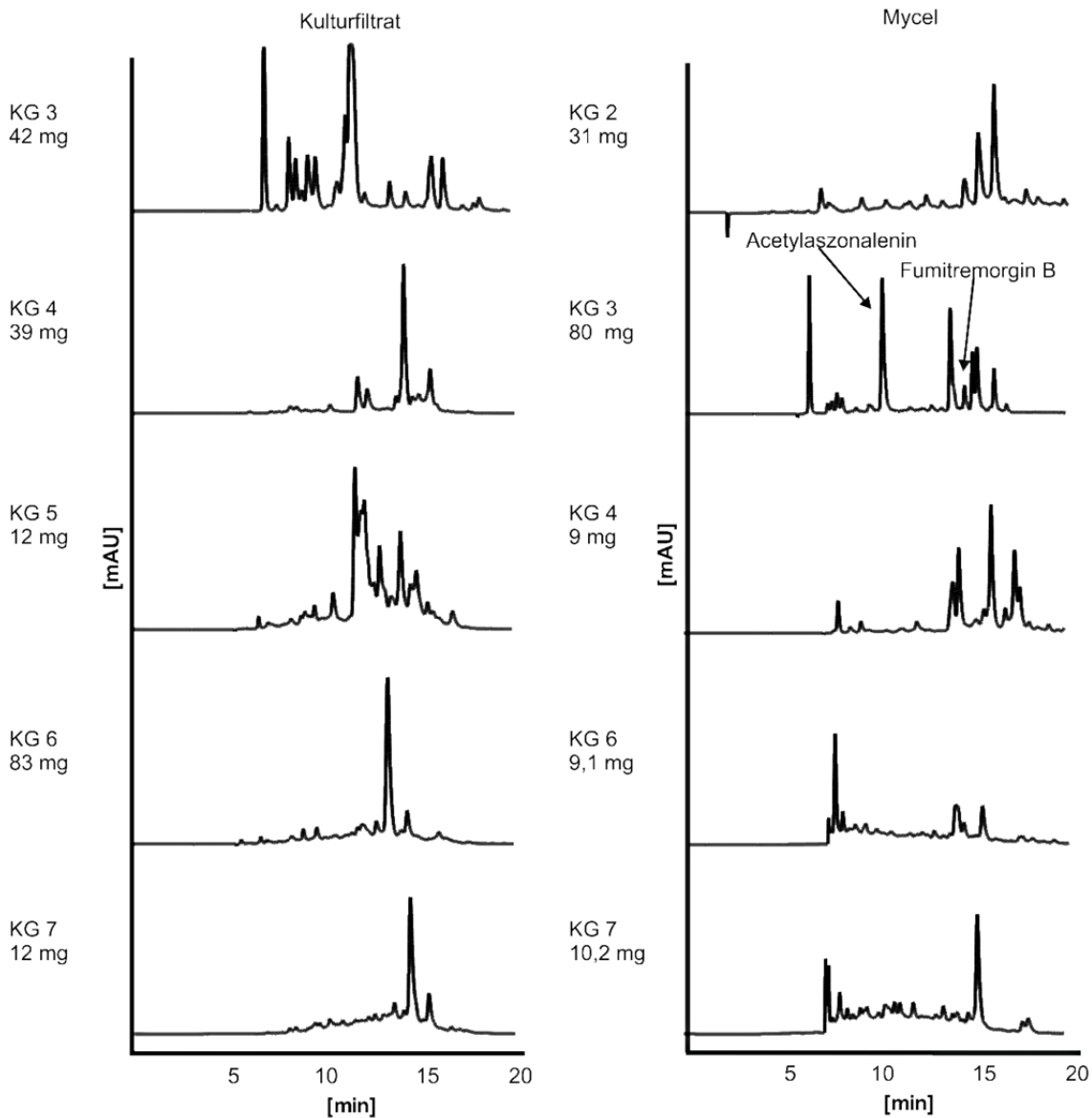


Abbildung 3-25: HPLC-Chromatogramme der Kieselgelfractionen (KG 2-KG 7), MEP-Medium, 37 °C, 120 rpm

Durch die Chromatographie an Kieselgel konnte das erhaltene Pilzextrakt aufgetrennt werden. Die erhaltenen Fractionen wurden im Folgenden bezüglich der Auftrennung, Menge und UV-Spektren untersucht. So wurde die Kieselgelfraktion KG 3 des Mycels für weitere

Analysen mittels semipräparativer HPLC ausgewählt. Das Flussdiagramm ist in folgender Abbildung 3-26 dargestellt.

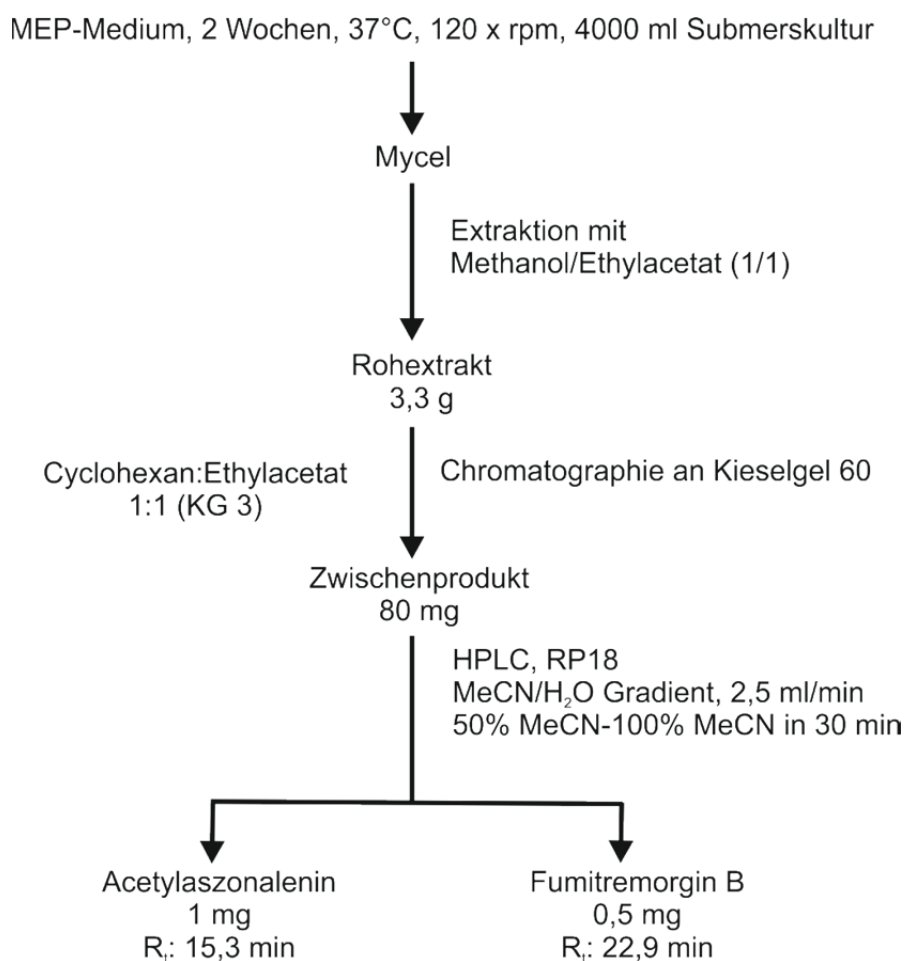
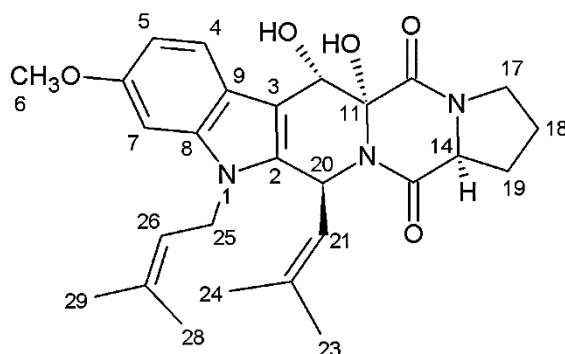


Abbildung 3-26: Flussdiagramm, Submerskultur, MEP-Medium, 37 °C, 120 rpm

Aus der Kieselgelfraktion 3 des Mycels konnten zwei Naturstoffe isoliert und deren Struktur mittels ^1H -NMR und ESI-MS Analysen aufgeklärt werden. Unter anderem konnte wieder Acetylaszonalenin isoliert werden (1 mg). Das erhaltene ^1H -NMR-Spektrum stimmte mit dem aus 2.3.3.3. überein. Deshalb wurde es hier nicht noch einmal abgebildet. In der folgenden Tabelle 3-21 sind die ^1H -NMR Daten der zweiten Substanz, welche als Fumitremorgin B identifiziert werden konnte, dargestellt. Da hiervon jedoch nur 0,5 mg isoliert werden konnten ist das erhaltene Spektrum etwas schwach.

Tabelle 3-21: ^1H -NMR Daten des isolierten Fumitremorgin B, verglichen mit (Grundmann *et al.*, 2008). Beide Spektren wurden bei 500 MHz in CDCl_3 aufgenommen.



| Position | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) (Grundmann <i>et al.</i> , 2008) | Position | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) (Grundmann <i>et al.</i> , 2008) |
|----------|--|---|------------------|--|---|
| H-4 | 7,83 d (8,6) | 7,85 d (8,7) | H-19 | 2,47 m | 2,48 m |
| H-5 | 6,79 dd (8,7; 2,3) | 6,80 dd (8,7; 2,3) | | 2,35 m | 2,10 m ^b |
| H-7 | 6,69 d (1,8) | 6,70 d (2,3) | H-21 | 4,69 d (10,0) | 4,71 dt (10,0; 1,2) ^a |
| H-10 | 5,76 d (0,8) | 5,77 dd (2,6; 0,8) | H-23 | 1,69 s | 1,63 d (1,2) |
| OH-10 | - | 4,70 d (2,6) ^a | H-24 | 2,01 s | 1,99 d (1,2) ^c |
| OH-11 | - | 3,99 s | H-25 | 4,53 br s | 4,54 m |
| H-14 | 4,44 dd (9,5; 7,0) | 4,45 dd (10,0; 7,0) | H-26 | 5,02 m | 5,04 td (5,3; 1,0) |
| H-17 | 3,64 dd (8,8; 4,3) | 3,64 dd (9,0; 4,5) | H-28 | 1,84 s | 1,70 d (1,0) |
| H-18 | 2,04 m | 2,10 m ^b | H-29 | 1,98 s | 1,85 d (1,0) |
| | | 1,98 m ^c | OCH ₃ | 3,84 s | 3,84 s |

^{a,b,c} Signale überlappen

In diesem Spektrum konnten wieder die beiden Prenyl-Einheiten mit den vier Methylgruppen (δ_{H} 2,01; 1,98; 1,84 und 1,69 ppm) beobachtet werden. Die drei aromatischen Signale des Indolringes mit der Methoxygruppe bei δ_{H} 3,84 ppm konnten ebenfalls detektiert werden. Zusätzlich konnte die Struktur von Fumitremorgin B wieder mittels ESI-MS bestätigt werden ($[\text{M}+\text{Na}]^+ m/z = 502$), das ^1H -NMR und das ESI-MS-Spektrum befinden sich im Anhang unter 6.7.1.

3.3.3.5. Isolierung und Strukturaufklärung von Acetylaszonalenin, 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C, 6-Methoxyspirotryprostatin B und Spirotryprostatin A aus der Kultivierungsbedingung 3 (Emerskultur, PD-Medium, 37 °C, 120 rpm)

Die Kulturfiltrat und Mycel Extrakte der Kultivierungsbedingung 3 wurden auch über Kieselgel chromatographiert. In folgender Abbildung 3-27 sind die HPLC-Chromatogramme der erhaltenen Kieselgelfractionen (KG) abgebildet.

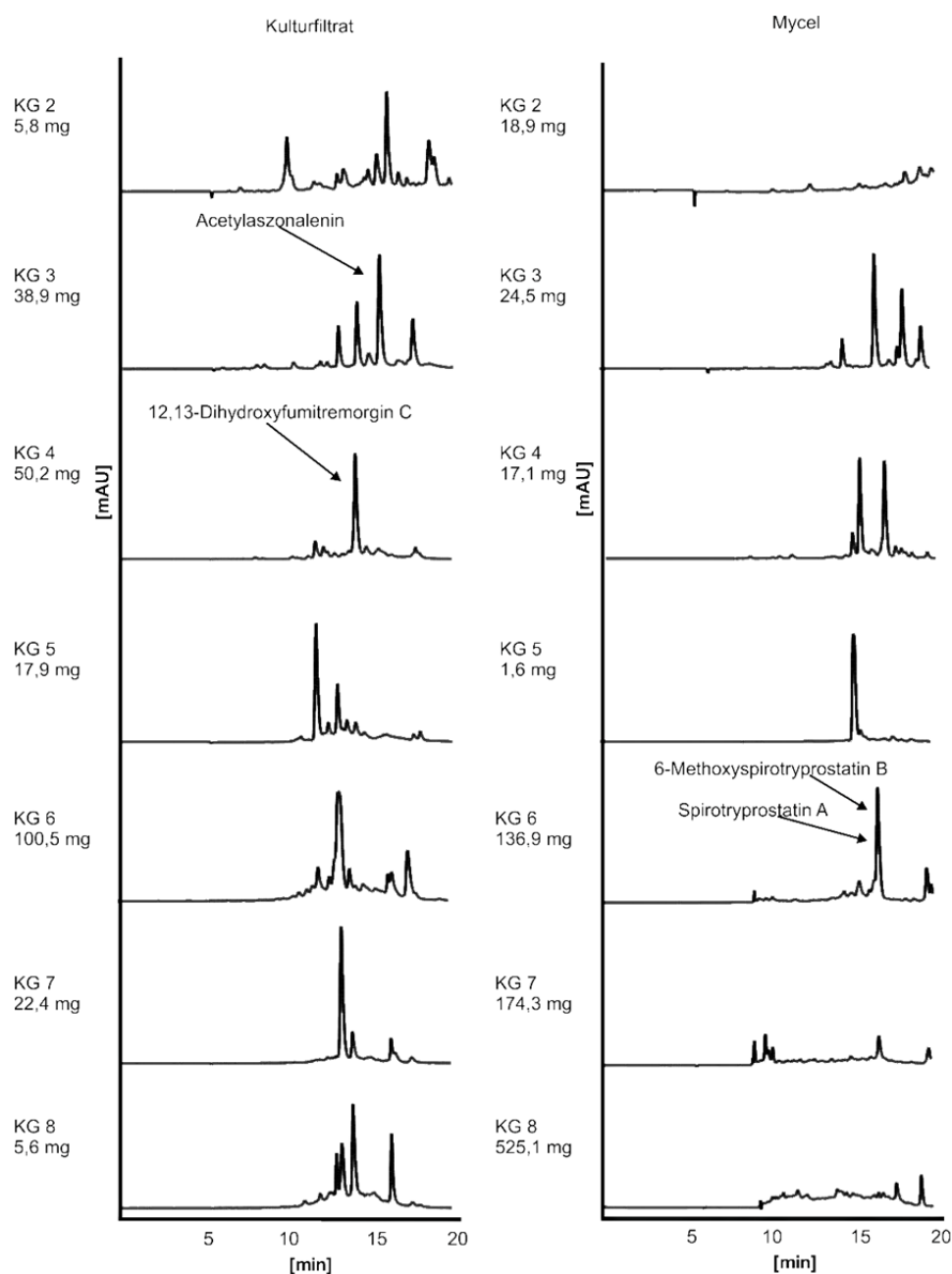


Abbildung 3-27: HPLC-Chromatogramme der Kieselgelfractionen (KG 2-KG 8), PD-Medium, 37 °C, 120 rpm

Die beiden Pilzextrakte konnten wieder mittels Chromatographie an Kieselgel aufgetrennt werden. Die erhaltenen Fraktionen wurden wiederum bezüglich der Auftrennung, Menge und UV-Spektren untersucht. So wurden die Kieselgelfraktion 6 (KG 6) des Mycel und die Kieselgelfraktionen 3 und 4 (KG 3+KG 4) des Kulturfiltrates für weitere Analysen mittels semipräparativer HPLC ausgewählt. Das Flussdiagramm ist in folgender Abbildung 3-28 dargestellt.

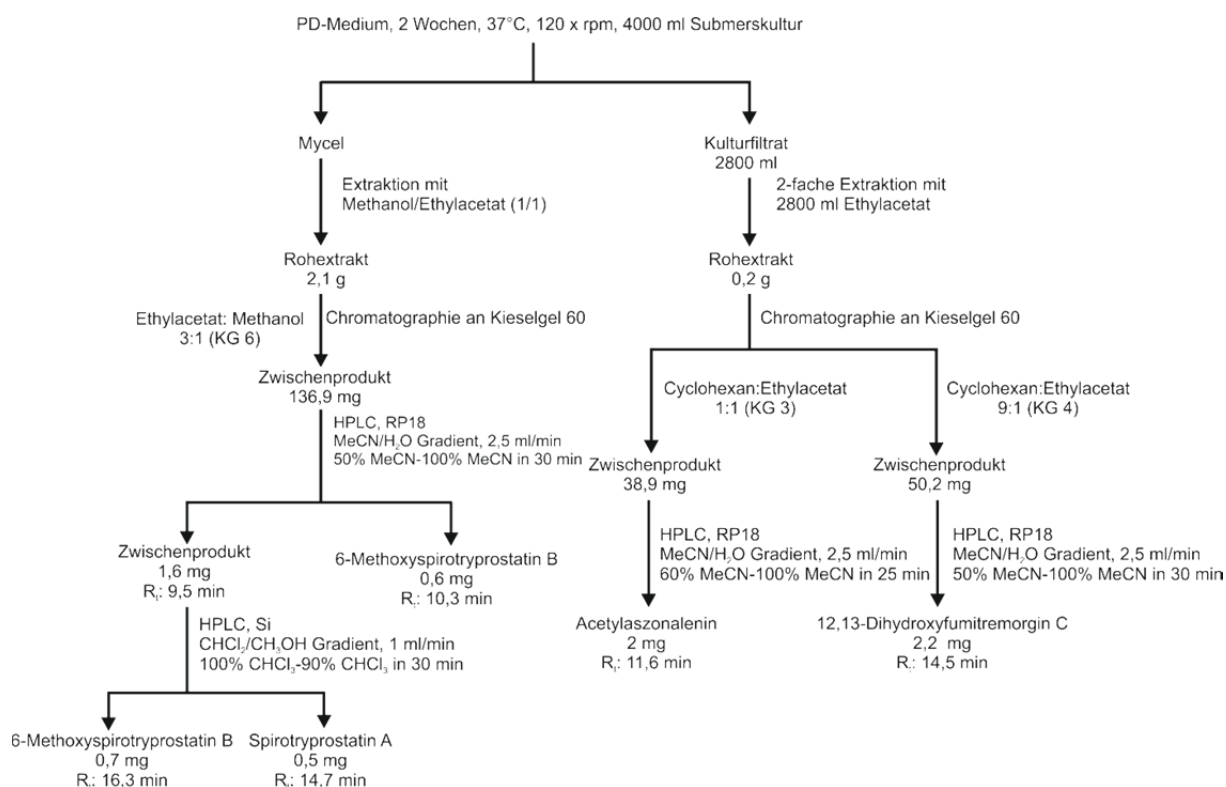
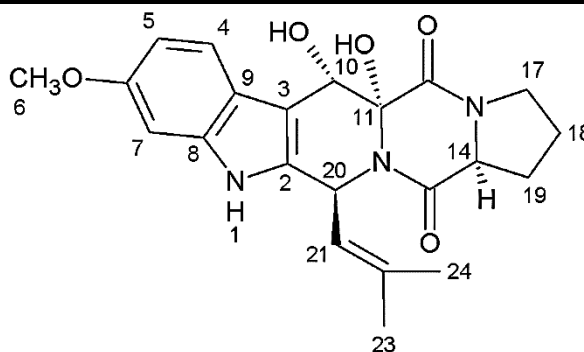


Abbildung 3-28: Flussdiagramm, Submerskultur, PD-Medium, 37 °C, 120 rpm

Insgesamt konnte mittels ^1H -NMR- und ESI-MS-Spektroskopie vier der isolierten Substanzen eine Struktur zugeordnet werden. Unter anderem konnte wieder Acetylaszonalenin (2 mg) isoliert werden, da das ^1H -NMR-Spektrum wieder identisch mit dem unter 2.3.3.3. beschrieben war, wird es hier nicht mehr dargestellt. Neben Acetylaszonalenin konnten 2,2 mg 12,13-Dihydroxyfunitremorgin C mittels semipräparativer HPLC isoliert werden. Die ^1H -NMR Daten sind in folgender Tabelle 3-22 abgebildet.

Tabelle 3-22: ^1H -NMR Daten des isolierten 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C, verglichen mit (Grundmann *et al.*, 2008). Beide Spektren wurden bei 500 MHz in CDCl_3 aufgenommen.



| Position | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) (Grundmann <i>et al.</i> , 2008) | Position | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) (Grundmann <i>et al.</i> , 2008) |
|----------|--|---|------------------|--|---|
| NH-1 | 7,67 br s | 7,63 br s | H-18 | 2,05 m ^a | 2,08 m ^a |
| H-4 | 7,79 d (8,6) | 7,80 d (8,8) | | 2,05 m ^a | 1,97 m ^b |
| H-5 | 6,90 dd (8,6; 2,2) | 6,81 dd (8,8; 2,3) | H-19 | 2,48 m | 2,49 m |
| H-7 | 6,83 d (2,0) | 6,85 d (2,3) | | 2,05 m ^a | 2,08 m ^a |
| H-10 | 5,74 d (1,2) | 5,75 dd (2,8; 1,2) | H-20 | 5,86 d (9,5) | 5,88 dd (9,6; 1,2) |
| OH-10 | - | 4,65 d (2,8) | H-21 | 4,78 dt (9,5; 1,4) | 4,8 dt (9,6; 1,2) |
| OH-11 | - | 4,10 s | H-23 | 2,00 s | 2,01 d (1,2) ^b |
| H-14 | 4,42 dd (10,0; 6,8) | 4,43 dd (10,1; 6,8) | H-24 | 1,66 s | 1,67 d (1,2) |
| H-17 | 3,64 m | 3,66 dd (9,1; 6,0) | OCH ₃ | 3,82 s | 3,84 s |

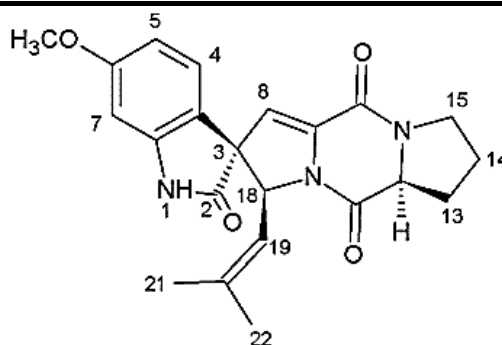
^{a,b} Signale überlappen

Da es sich hierbei genauso wie bei Fumitremorgin A und Verruculogen um ein Fumitremorgin-Grundgerüst handelte, konnten ebenfalls die drei aromatischen Signale mit der Methoxygruppe bei δ_{H} 3,82 ppm sowie die Protonen des Prolinringes detektiert werden. Anders als bei Verruculogen und Fumitremorgin A konnte man hier jedoch nur eine Prenylierung, sprich zwei Methylgruppen (2,00 s und 1,66 s) und ein Duplett vom Triplet bei δ_{H} 4,78 ppm erkennen. Die Struktur von 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C konnte ebenfalls mittels ESI-MS bestätigt werden. ($[\text{M} + \text{H}]^+ m/z = 412$). Die beiden Spektren sind im Anhang unter 6.7.7. abgebildet.

Neben 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C und Acetylaszonalenin konnten ebenfalls 6-Methoxyspirotryprostatin B und Spirotryprostatin A aus der Kieselgelfraktion 6 (KG 6) des Mycels isoliert werden. Durch semipräparative HPLC mittels RP-18 Säule konnte neben 0,6 mg 6-Methoxyspirotryprostatin B ein Gemisch (1,6 mg) von 6-Methoxyspirotryprostatin B und Spirotryprostatin A isoliert werden. Dieses wurde anschließend mittels Normalphasen

HPLC erfolgreich getrennt. In folgender Tabelle 3-23 sind zunächst die ^1H -NMR Daten von 6-Methoxyspiroryprotstain B abgebildet.

Tabelle 3-23: ^1H -NMR Daten des isolierten 6-Methoxyspiroryprotstain B, verglichen mit (Zhang *et al.*, 2008). Beide Spektren wurden bei 500 MHz in CDCl_3 aufgenommen.



| Position | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) (Zhang <i>et al.</i> , 2008) | Position | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) (Zhang <i>et al.</i> , 2008) |
|----------|--|---|------------------|--|---|
| NH-1 | - | 8,49 s | H-14 | 1,98 m 2,10 m ^a | 1,99 m 2,13 m |
| H-4 | 6,96 d (8,5) | 6,95 d (8,2) | H-15 | 3,56 m 3,82 m | 3,58 m 3,84 m |
| H-5 | 6,52 dd (8,5; 2,3) | 6,51 dd (8,3; 2,3) | H-18 | 5,38 d (9,0) | 5,39 d (9,2) |
| H-7 | 6,43 d (2,3) | 6,47 d (2,3) | H-19 | 5,19 dt (9,0; 1,4) | 5,20 d (9,2) |
| H-8 | 5,75 s | 5,75 s | H-21 | 1,59 s | 1,59 s |
| H-12 | 4,33 dd (10,5; 6,0) | 4,35 dd (10,6; 5,9) | H-22 | 1,30 s | 1,29 s |
| H-13 | 2,48 m 2,10 m ^a | 2,49 m 1,99 m | OCH ₃ | 3,80 s | 3,79 s |

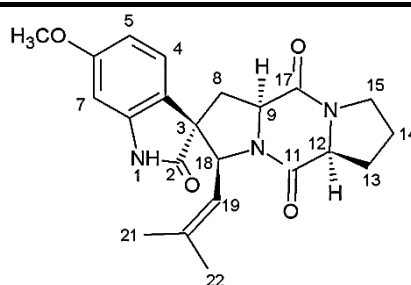
^a Signale überlappen

In diesem Spektrum konnten wieder die drei aromatischen Signale des Indolringes mit Methoxygruppe detektiert werden, allerdings waren die Signale im Vergleich zu 12,13-Dihydroxyfunitremorgin C und den anderen Funitremorginen deutlich ins Tieffeld verschoben. So bestand zwischen den beiden Dupletts von H-4 eine Differenz von 0,83 ppm zwischen den beiden Spektren von 12,13-Dihydroxyfunitremorgin C und 6-Methoxyspiroryprotstain B. Auch eine Prenyl-Einheit mit zwei Singulett bei δ_{H} 1,59 bzw. 1,30 ppm und einem Duplett vom Triplet bei δ_{H} 5,19 ppm konnten detektiert werden, diese sind ebenfalls im Vergleich zu 12,13-Dihydroxyfunitremorgin C etwas verschoben. Das Spektrum wurde mit den Daten aus der Literatur von Zhang *et al.*, 2008 verglichen, und stimmte bis auf eine maximale Abweichung von 0,04 ppm mit ihm überein. Die endgültige

Strukturbestätigung konnte durch ein ESI-MS-Spektrum erhalten werden ($[M+H]^+$ $m/z = 394$).

In der folgenden Tabelle 3-24 sind nun die ^1H -NMR Daten des isolierten Spirotryprostatin A (0,5 mg) dargestellt.

Tabelle 3-24: ^1H -NMR Daten des isolierten Spirotryprostatin A, verglichen mit (Cui *et al.*, 1996b). Beide Spektren wurden bei 500 MHz in CDCl_3 aufgenommen.



| Position | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) (Cui <i>et al.</i> , 1996) | Position | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) (Cui <i>et al.</i> , 1996) |
|----------|--|---|------------------|--|---|
| H-4 | 6,93 d (8,6) | 6,93 d (8,5) | H-8 | 2,60 dd (13,8; 10,9) | 2,60 dd (13,2; 10,5) |
| H-5 | 6,50 dd (8,6; 2,2) | 6,50 dd (8,5; 2,4) | H-8 | 2,39 dd (13,8; 7,1) | 2,39 dd (13,2; 6,8) |
| H-7 | 6,42 d (2,2) | 6,43 d (2,4) | H-13 | 2,28 m | 2,27 m |
| H-9 | 4,99 dd (10,9; 7,1) | 4,99 dd (10,5; 6,8) | | 2,31 m | 2,31 m |
| H-19 | 5,03 dm (9,1) | 5,03 dm (10,0) | H-14 | 2,02 m | 2,07 m |
| H-18 | 4,78 d (9,1) | 4,78 d (10,0) | H-14 | 1,96 m | 1,97 m |
| H-12 | 4,28 t (8,2) | 4,28 dd (8,3; 7,8) | H-21 | 1,65 s | 1,65 s |
| H-15 | 3,60 m | 3,61 m | H-22 | 1,17 s | 1,26 s |
| H-15 | 3,56 m | 3,57 m | OCH ₃ | 3,80 s | 3,80 s |

Im Vergleich zu 6-Methoxyspirotryprostatin B konnte in diesem Spektrum bei δ_{H} 2,6 ppm und 4,99 ppm je ein Duplett vom Duplett detektiert werden, diese Signale von H-8 und H-9 resultierten aus der fehlenden Doppelbindung zwischen H-8 und H-9. Des Weiteren konnte man auch hier die drei aromatischen Signale mit der Methoxygruppe und den Protonen des Prolinringes erkennen. Durch einen Vergleich der Daten mit der Literatur (Cui *et al.*, 1996b) konnte die Substanz als Spirotryprostatin A identifiziert werden. Auch das ESI-MS-Spektrum, welches zusammen mit dem ^1H -NMR im Anhang unter 6.7.8. zu finden ist, bestätigte die Struktur ($[M+H]^+$ $m/z = 396$ und $[M+Na]^+$ $m/z = 418$).

3.3.3.6. Isolierung und Strukturaufklärung von Aszonalenin, Verrucologen TR-2 und Substanz 15 aus der Kultivierungsbedingung 4 (Emerskultur, HA-Medium, 25 °C, 0 rpm)

Die erhaltenden Kulturfiltrat und Mycel Extrakte der Kultivierungsbedingung 4 wurden ebenfalls über Kieselgel chromatographiert und somit aufgetrennt. Die HPLC-Chromatogramme der erhaltenen Kieselgelfractionen (KG) sind in folgender Abbildung 3-29 dargestellt.

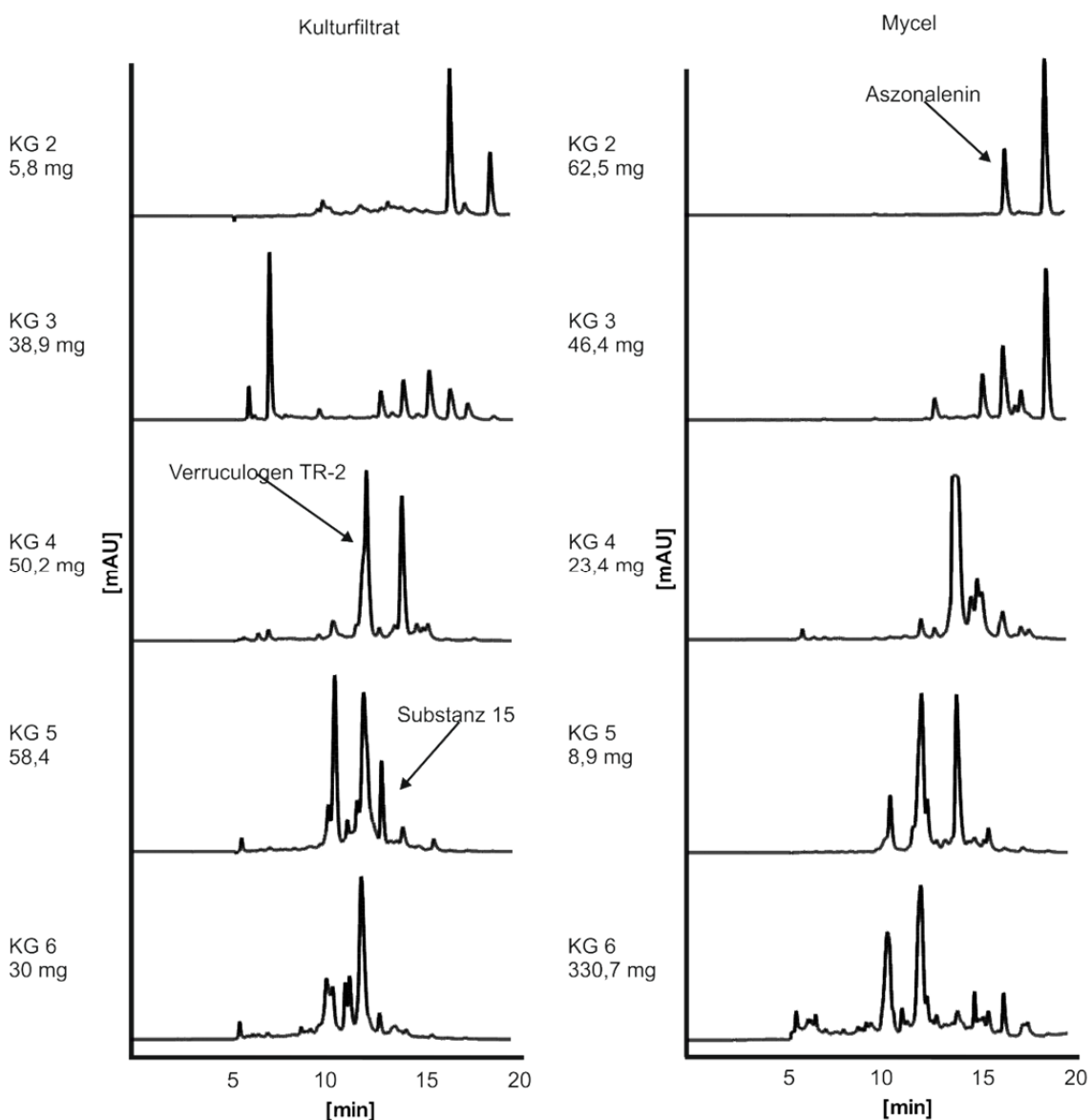


Abbildung 3-29: HPLC-Chromatogramme der Kieselgelfractionen (KG 2-KG 6), HA-Medium, 25 °C, 0 rpm

Die erhaltenen Fraktionen wurden wiederum bezüglich der Auftrennung, Menge und UV-Spektren untersucht. So wurde die Kieselgelfraktion 2 (KG 2) des Mycels und die Kieselgelfraktionen 4 und 5 (KG 4+KG 5) des Kulturfiltrates für weitere Analysen mittels semipräparativer HPLC ausgewählt. Das Flussdiagramm ist in folgender Abbildung 3-30 dargestellt.

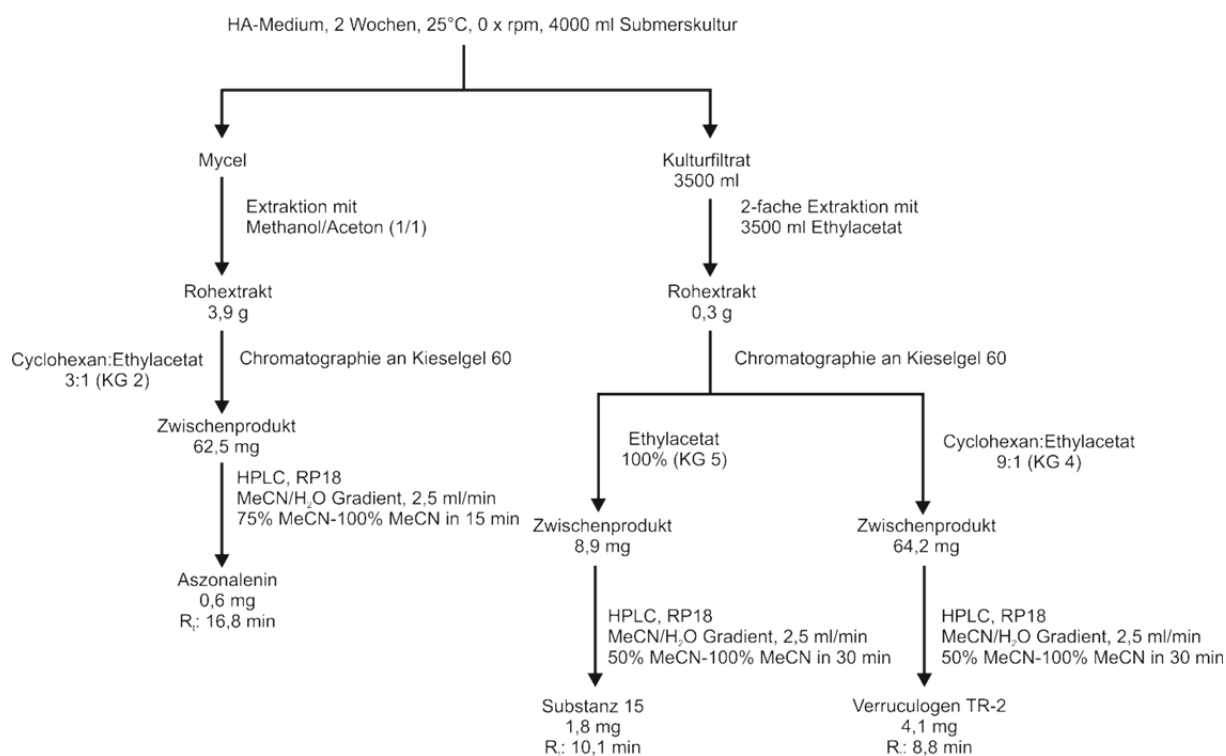
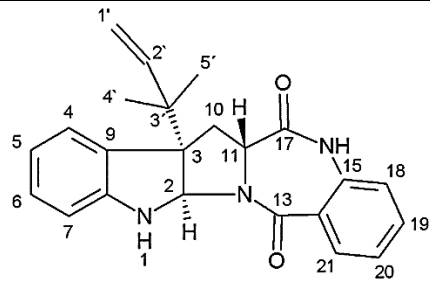


Abbildung 3-30: Flussdiagramm, Submerskultur, HA-Medium, 25 °C, 0 rpm

Aus dieser Kultivierungsbedingung konnte drei der isolierten Substanzen mittels NMR- und ESI-MS-Spektroskopie einer Struktur zugeordnet werden. So konnten aus der Kieselgelfraktion 2 (KG 2) des Mycels 0,6 mg Aszonalenin isoliert werden. Die ^1H -NMR Daten sind in folgender Tabelle 3-25 dargestellt.

Tabelle 3-25: : ^1H -NMR Daten des isolierten Aszonalenins, verglichen mit (Yin *et al.*, 2009a). Beide Spektren wurden bei 500 MHz in CDCl_3 aufgenommen.

|  | | | | | |
|--|--|---|----------|--|---|
| Position | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (Yin <i>et al.</i> , 2009a) | Position | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (Yin <i>et al.</i> , 2009a) |
| H-2 | 5,58 s | 5,58, s | H-18 | 6,89 d (7,8) | 6,90 d (8,2) |
| H-4 | 7,15 d (7,6) | 7,15 d (7,6) | H-19 | 7,44 td (7,6; 1,6) | 7,44 td (7,9; 1,0) |
| H-5 | 6,72 td, (7,7; 1,1) | 6,72 t (7,4) | H-20 | 7,25 t (7,8) | 7,22 t (7,6) |
| H-6 | 7,08 td (7,8; 1,3) | 7,08 t (7,6) | H-21 | 7,84 dd (7,9; 1,4) | 7,83 d (7,9) |
| H-7 | 6,62 d (7,8) | 6,62 d (7,9) | H-1' | 5,15 dd (10,0; 1,1) | 5,14 d (10;7) |
| H-10 | 3,46 dd (13,9; 7,7) | 3,46 dd (14,2; 7,6) | | 5,11 dd (17,3; 1,1) | 5,11 d (17,3) |
| | 2,42 dd (13,9; 8,8) | 2,42 dd (14,0; 9,0) | H-2' | 6,11 dd (17,3; 10,7) | 6,11 dd (17,3; 10,7) |
| H-11 | 3,99 t (8,7) | 3,99 br t (8,1) | H-4' | 1,06 s | 1,06 s |
| NH-16 | 7,59 s | 7,91 s | H-5' | 1,14 s | 1,14 s |

Das ^1H -NMR-Spektrum von Aszonalenin wies bis auf die fehlende Acetylgruppe starke Ähnlichkeiten mit dem Spektrum von Acetylaszonalenin auf. So konnten auch hier die Signale einer reversen Prenylierung beobachten werden (δ_{H} 1,14 ppm s; 1,06 s; 6,11 dd; 5,15 dd; 5,11 dd) und acht aromatische Signale, wobei wieder immer vier miteinander koppelten.

Neben Aszonalenin konnten 4,1 mg eines weiteren Naturstoffes aus der Kieselgelfraktion 4 (KG 4) des Kulturfiltrates isoliert werden. Die ^1H -NMR Daten sind in folgender Tabelle 3-26. dargestellt.

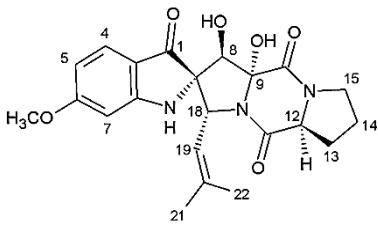
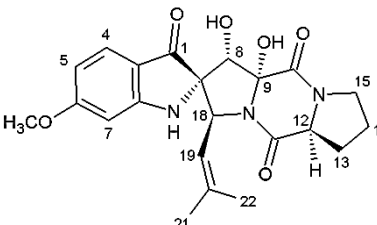
Tabelle 3-26: ^1H -NMR Daten des isolierten Verruculogen TR-2 (24), verglichen mit (Hermekens *et al.*, 1988). Beide Spektren wurden bei 500 MHz in CDCl_3 aufgenommen.

| Position | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (Hermekens <i>et al.</i> , 1988). | Position | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (Hermekens <i>et al.</i> , 1988). |
|----------|--|--|------------------|--|--|
| NH-1 | 8,96 s | 9,04 s | H-14 | 4,45 dd (9,6; 6,6) | 4,45 m |
| H-4 | 7,80 d (8,8) | 7,82 d | OH-10 | - | 4,02 d |
| H-5 | 6,77 dd (8,7; 2,3) | 6,86-6,77 m | OCH ₃ | 3,82 s | 3,95 s |
| H-7 | 6,83 d (2,0) | 6,86-6,77 m | H-17 | 3,62 t (4,3) | 3,70-3,61 m |
| H-10 | 5,71 s | 5,72 d | H-21, | 1,71 dd (9,1 14,0) | 2,12-1,65 m |
| | | | H-18, | 2,50 m | 2,51 m |
| | | | H-19 | 1,9-2,1 m | |
| H-20 | 5,45 dt (7,9; 0,9) | 5,46 dd | H-23 | 1,53 s | 1,55 s |
| OH-11 | - | 4,6 d | H-24 | 1,16 s | 1,18 s |

Dieser Naturstoff konnte dank ^1H -NMR und ESI-MS als Verruculogen TR-2 identifiziert werden, beide Spektren sind im Anhang unter 6.7.6. zu finden. Im Vergleich zu 12,13-Dihydroxyfunitremorgin C konnte für H-21 in diesem Spektrum kein Duplett vom Triplet bei δ_{H} 4,78 ppm, sondern ein Multiplett bei δ_{H} 1,7 – 2,5 ppm detektiert werden. Auch die beiden Methylgruppen des ursprünglichen Prenyl-Restes waren etwas verschoben. Außerdem konnte man für H-20 ein Duplett vom Triplet erkennen und nicht wie bei 12,13-Dihydroxyfunitremorgin C ein Duplett. Diese Veränderungen beruhten auf der Hydroxylierung des H-22 des Prenyl-Restes. Die Daten wurden mit der Literatur (Hermekens *et al.*, 1988) verglichen und stimmten bis auf eine maximale Abweichung von 0,08 ppm überein. Auch das ESI-MS-Spektrum mit einem Peak bei $m/z = 430$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) bestätigte die angenommene Struktur von Verruculogen TR-2.

Zusätzlich konnten 1,8 mg einer bisher unbekannten Verbindung aus der Kieselgelfraktion 5 (KG 5) des Kulturfiltrates isoliert werden. In folgender Tabelle 3-27 sind die ^1H -NMR Daten dargestellt. Da dieser Substanzklasse bisher kein Name gegeben wurde, wird dieser Naturstoff im folgenden Substanz 15 genannt.

Tabelle 3-27: ^1H -NMR Daten von Substanz 15 und Compound 1 (Wang *et al.*, 2008). Beide Spektren wurden bei 500 MHz in CDCl_3 aufgenommen.

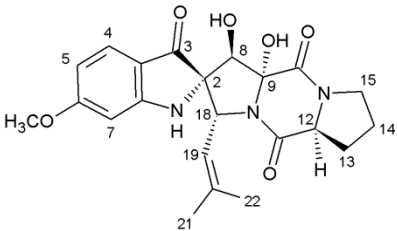
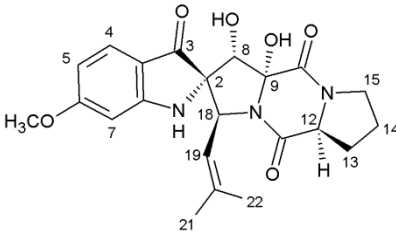
| Substanz 15 | | Compound 1 (Wang <i>et al.</i> , 2008) | |
|---|---|--|-----------|
|  | |  | |
| Position | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | δ_{H} [ppm] multi. (J [Hz]) | Differenz |
| H-4 | 7,48 d (8,6) | 7,43 d (8,7) | + 0,05 |
| H-5 | 6,42 dd (8,6; 2,1) | 6,36 dd (8,7; 1,9) | + 0,06 |
| H-7 | 6,26 d (2,1) | 6,24 d (1,9) | + 0,02 |
| H-8 | 4,69 s | 4,75 s | - 0,06 |
| H-12 | 4,60 dd (9,5; 7,3) | 4,60 dd (9,6; 7,3) | ± 0 |
| H-13 | 2,06 m ^a | 2,06 m | ± 0 |
| | 2,37 m | 2,37 m | ± 0 |
| H-14 | 1,94 m | 1,94 m | ± 0 |
| | 2,06 m ^a | 2,06 m | ± 0 |
| H-15 | 3,56 m | 3,56 m | ± 0 |
| H-18 | 4,82 d (9,4) | 4,80 s | ± 0 |
| H-19 | 4,78 d (9,4) | 4,80 s | ± 0 |
| H-21 | 1,56 s | 1,56 s | ± 0 |
| H-22 | 1,78 s | 1,76 s | + 0,02 |
| 6-OMe | 3,85 s | 3,80 s | + 0,05 |
| 8-OH | 3,48 s | 5,38 br s | - 1,9 |
| 9-OH | 7,39 s | 7,42 br s | - 0,03 |
| NH | 4,92 s | | |

^a Signale überlappen

Zusätzlich mit dem ESI-MS-Spektrum ($[\text{M}+\text{Na}]^+$ $m/z = 450$) konnte mit Vergleichen in der Literatur (Wang *et al.*, 2008) eine Substanz gefunden werden, welche ein ähnliches ^1H -NMR-Spektrum aufweist wie die isolierte Substanz. Zum besseren Vergleich sind die Differenzen der einzelnen Signale in einer dritten Spalte in Tabelle 3-27 abgebildet. Hierbei ist zu erkennen, dass die Signale der Substanz im aromatischen Bereich und in der Prenyl-Einheit etwas ins Tieffeld verschoben waren. Nur H-8 wurde, anders als die anderen Signale, ins Hochfeld verschoben. Aus diesem Grund wurden von dieser Substanz weitere NMR-Spektren aufgenommen (^{13}C -NMR, HSQC, HMBC und NOESY). Alle Spektren sind im Anhang unter

6.7.10. zu finden. In folgender Tabelle 3-28. sind die ^{13}C Signale beider Verbindungen gegenübergestellt.

Tabelle 3-28: ^{13}C -NMR Daten von Substanz 15 und Compound 1 (Wang *et al.*, 2008). Beide Spektren wurden bei 500 MHz in CDCl_3 aufgenommen.

| Substanz 15 | | Compound 1 (Wang et al., 2008) | |
|---|------------------|--|-----------|
|  | |  | |
| Position | δ_c [ppm] | δ_c [ppm] | Differenz |
| C-2 | 75,2 | 75,4 | - 0,2 |
| C-3 | 200,1 | 200,1 | ± 0 |
| C-3a | 112,7 | 112,2 | + 0,5 |
| C-4 | 127,2 | 126,8 | + 0,4 |
| C-5 | 110,5 | 110,2 | + 0,3 |
| C-6 | 169,5 | 169,2 | + 0,3 |
| C-7 | 94,9 | 94,4 | + 0,5 |
| C-7a | 165,2 | 165,2 | ± 0 |
| C-8 | 74,1 | 73,5 | + 0,6 |
| C-9 | 86,4 | 86,3 | + 0,1 |
| C-11 | 169,2 | 169,0 | + 0,2 |
| C-12 | 60,7 | 60,5 | + 0,2 |
| C-13 | 27,8 | 27,6 | + 0,2 |
| C-14 | 23,4 | 23,2 | + 0,2 |
| C-15 | 45,2 | 45,1 | + 0,1 |
| C-17 | 165,2 | 165,2 | ± 0 |
| C-18 | 55,5 | 55,2 | + 0,3 |
| C-19 | 120,1 | 120,0 | + 0,1 |
| C-20 | 141,8 | 140,9 | - 0,1 |
| C-21 | 18,8 | 18,5 | + 0,3 |
| C-22 | 26,1 | 25,8 | + 0,3 |
| 6-OMe | 56,0 | 55,7 | + 0,3 |

Auch im ^{13}C -NMR-Spektrum konnten geringe Verschiebungen der Signale detektiert und beobachtet werden. Das HSQC- und HMBC-Spektrum zeigte aber eindeutig, dass es sich im Grundgerüst um die Struktur von Compound 1 in Wang et al., 2008 handelte. So korrelieren im HSQC-Spektrum alle Protonen mit den erwarteten Kohlenstoffatomen und im HMBC-Spektrum konnten ähnliche Korrelationen wie in der Veröffentlichung von Prof. Zhus Arbeitsgruppe detektiert werden (Wang et al., 2008). Im NOESY-Spektrum hingegen konnte man sehen, dass es sich hierbei doch um eine neue Substanz mit einer anderen Stereochemie handeln muss. Folgende Abbildung 3-31. zeigt die NOESY- und HMBC-Korrelationen.

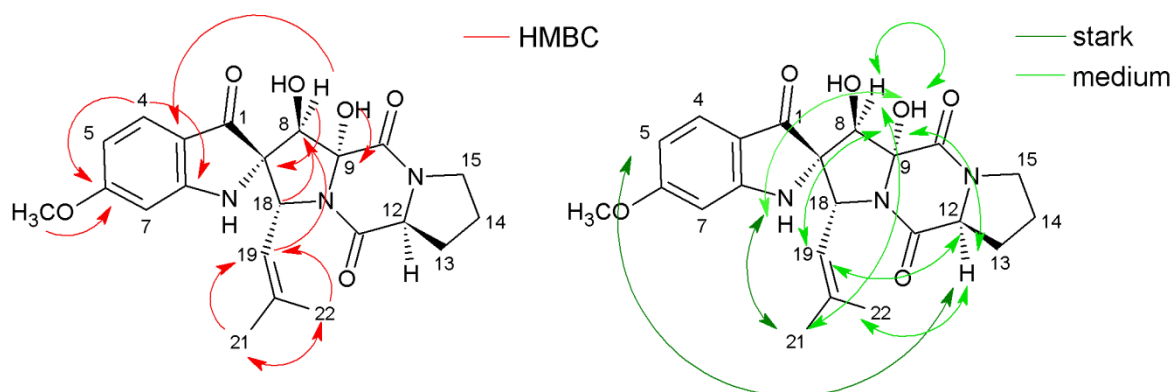


Abbildung 3-31: HMBC (rot) und NOESY (grün) Korrelationen von Substanz 15

Die NOESY Korrelationen von Compound 1 zeigten das, sich H-7, H-12, H-18, 8-OH und 9-OH auf einer Seite befinden und H-8, H-9 und H-19 auf der anderen. Dies wurde auf NOESY Korrelationen zwischen H-8 und H-19, 8-OH und H-18, H-7 und 9-OH sowie 9-OH mit H-12 und H-18 begründet. Bei Substanz 15 hingegen korrelierte 9-OH zwar auch mit H-12 aber zusätzlich auch mit H-19 und H-8. Dies sprach also dafür, dass die beiden OH-Gruppen nicht auf einer Seite in *cis*-Stellung sondern in *trans*-Stellung stehen. Bestätigt wurde diese Annahme ebenfalls durch die vorher bereits erwähnte deutliche Verschiebung des H-8 Signales im ^1H -NMR. Dadurch, dass nicht wie bei Compound 1 das in β -Position stehende H-8 mit H-19 korrelierte, sondern die in α -Position stehenden Protonen OH-9 und H-12, konnte hier die zweite Veränderung in der Stereochemie bewiesen werden. Zusätzlich zeigte Substanz 15 auch das erwartete charakteristische UV-Spektrum eines 6-O-Methylindol

Chromophors mit Maxima bei 220, 251, 286 und 392 nm (Wang *et al.*, 2008) (siehe Abbildung 3-32).

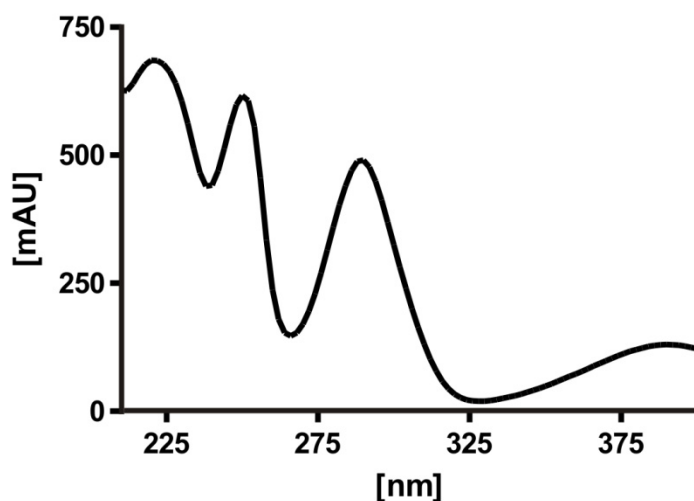
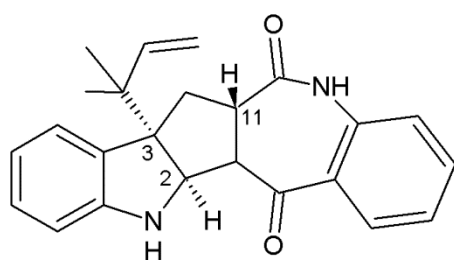


Abbildung 3-32: UV-Spektrum von Substanz 15

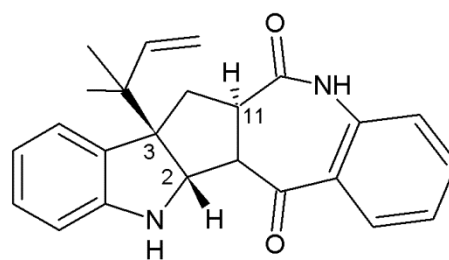
Insgesamt konnten also zehn verschiedene Sekundärmetabolite aus *N. fischeri* NRRL181 isoliert und charakterisiert werden. So konnten die Produkte des Ana-Clusters Aszonalenin und Acetylaszonalenin isoliert werden. Neben Fumitremorgin A auch die Vorstufen der Biosynthese: Verruculogen, Fumitremorgin B und 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C und zusätzlich auch Verruculogen TR-2, Spirotryprostatin A, 6-Methoxyspirotryprostatin B und der neue Naturstoff der als Substanz 15 bezeichnet wurde.

3.3.3.7. Circular dichroismus (CD) von Aszonalenin und Acetylaszonalenin

Die beiden isolierten Verbindungen Aszonalenin und Acetylaszonalenin wurden mittels CD-Messung untersucht, um herauszufinden, ob es sich bei den beiden Verbindungen um (2R, 3S, 11R)-Aszonalenin bzw. -Acetylaszonalenin oder um (2S, 3R, 11S)-Aszonalenin bzw. -Acetylaszonalenin handelte (siehe Abbildung 3-33) (Yin *et al.*, 2009a).



(2R, 3S, 11R) - Aszonalenin



(2S, 3R, 11S) - Aszonalenin

Abbildung 3-33: Strukturformeln von (2R-3S-11R)- und (2S-3R-11S)-Aszonalenin

Da in der Natur bisher nur die (2R, 3S, 11R)-Aszonalenin-Verbindung nachgewiesen werden konnte, wurde untersucht, ob es sich bei den isolierten Verbindungen um die 2S, 3R, 11S-Konfiguration handeln könnte. In folgender Abbildung 3-34 sind die CD-Spektren der beiden isolierten Verbindungen abgebildet.

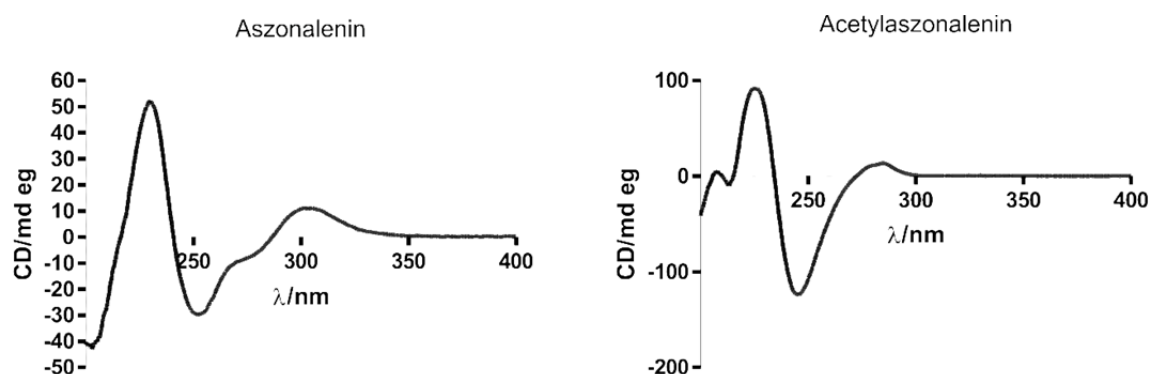


Abbildung 3-34: CD-Spektren von Aszonalenin und Acetylaszonalenin

Vergleicht man im Folgenden die beiden Spektren mit den Messungen aus der Literatur (Yin *et al.*, 2009a) stellt man fest, dass es sich bei beiden Verbindungen um die bereits bekannte (2R, 3S, 11R)-Konfiguration handelt.

3.4. Untersuchungen zur Biosynthese der isolierten Naturstoffe aus *N. fischeri* NRRL181

3.4.1. Einleitung

Da, wie unter 3.3. beschrieben, Fumitremorgin A aus *N. fischeri* NRRL181 isoliert und mittels ESI-MS- und NMR-Spektroskopie charakterisiert werden konnte, wurde durch Frau Dr. Kathrin Mundt der letzte Schritt der Biosynthese von Fumitremorgin A in *N. fischeri* aufgeklärt. Sie entdeckte die Prenyltransferase FtmPT3 (*NFIA_093400*) und charakterisierte sie biochemisch (Mundt *et al.*, 2012). Das Gen liegt jedoch, anders als erwartet, nicht neben dem Gencluster, welches für die Biosynthese von Verruculogen in *N. fischeri* NRRL181 verantwortlich ist, sondern es befindet sich auf einem anderen Chromosom. So liegt das Gencluster zur Biosynthese von Verruculogen auf Chromosom 8 (Contig 578) und durch Blast-Analysen des gesamten Contigs 580 mit FtmPT3 aus *N. fischeri* NRRL181 konnte eine hohe Übereinstimmung zu einem Segment auf Chromosom 2 in *A. fumigatus* Af293 festgestellt werden (Mundt *et al.*, 2012). Ein paar Gene zeigten jedoch auch Sequenzähnlichkeiten zu einigen Genen von *A. fumigatus* Af293 auf Chromosom 5, dies ist jedoch durch eine reziproke Translokation zwischen Chromosom 2 und 5 in *N. fischeri* NRRL181 zu erklären (Fedorova *et al.*, 2008). Durch weitere Blast-Analysen stellte sich heraus, dass für das Gen *NFIA_093400* und ebenso für weitere sechs benachbarte Gene von *NFIA_093430* bis *NFIA_093370* keine homologen Gene in *A. fumigatus* Af293 und A1163 zu finden sind (siehe Abbildung 3-34). Dies erklärt die Tatsache, dass bisher keine dritte Prenyltransferase in *A. fumigatus*, welche für die Prenylierung von Verruculogen zu Fumitremorgin A verantwortlich ist, gefunden wurde, obwohl Fumitremorgin A aus *A. fumigatus* isoliert wurde (Yamazaki *et al.*, 1980). *NFIA_093440* und *NFIA_093360* hingegen zeigen auf Aminosäureebene eine Sequenzähnlichkeit von 89% bzw. 93% mit *AFUA_2G17930* und *AFUA_2G17920* aus *A. fumigatus* Af293. Zwischen diese beiden Genen aus *A. fumigatus* Af293 wurde jedoch lediglich ein nichtkodierendes Segment von 3888 bp gefunden (Mundt *et al.*, 2012). Das heißt also, dass *N. fischeri* im Gegensatz zu *A. fumigatus* an dieser Stelle sieben zusätzliche Gene besitzt (siehe Abbildung 3-35). Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass diese Gene im Laufe der Evolution aus *A. fumigatus* deletiert wurden oder aber, dass die sieben Gene in *N. fischeri* durch horizontalen Gentransfer eingefügt wurden.

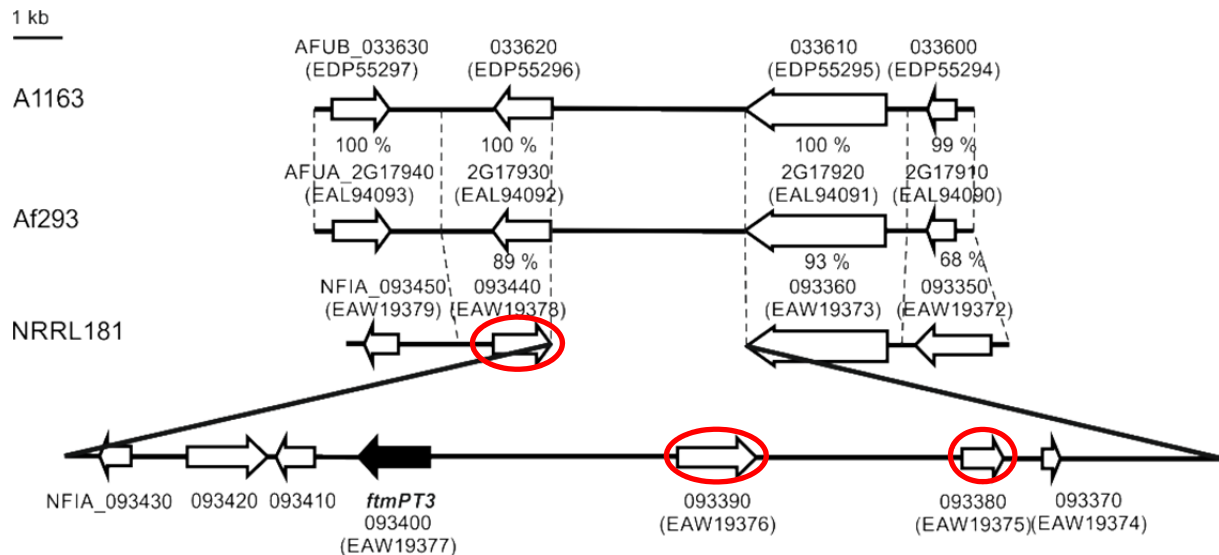


Abbildung 3-35: Potenzielles FtmPT3 Gencluster

FtmPT3 könnte also in einem weiteren bisher unbekannten Cluster liegen. Die benachbarten Gene von *ftmPT3* wurden alle geblastet und untersucht. Dabei zeigte *NFIA_093430* mit einer Länge von 615 bp, keinerlei Sequenzähnlichkeit zu einem bekannten Protein. Das folgende Produkt von *NFIA_093420* (1623 bp) zeigte Sequenzähnlichkeiten mit einer pilzlichen Typ1 Polyketid-Synthetase. *NFIA_093410* hingegen codiert für ein Polyketid mit 261 Aminosäuren, welches zur Ser/Thr Protein Phosphatase-Superfamilie gehört. EAW19376, codiert durch *NFIA_093390*, hat eine Größe von 528 Aminosäuren und stellt ein *Ankyrin repeat* Protein dar. Die darauffolgenden Produkte von *NFIA_093380* und *NFIA_093370* mit 261 bzw. 96 Aminosäuren zeigten keine Sequenzähnlichkeiten zu bekannten Proteinen auf. Im Folgenden wurden zwei Gene aus dieser Schleife in *N. fischeri* NRRL181 und ein Gen, welches Homologe in *A. fumigatus* besitzt, ausgewählt, um heterolog in *E. coli*- bzw. *S. cerevisiae*-Zellen exprimiert und biochemisch charakterisiert zu werden. Hierbei handelt es sich um *NFIA_093380*, *NFIA_093390* und *NFIA_093440*. Wobei *NFIA_093440* vermutlich ein Membranprotein darstellt, da es die putative NADB_Rossmann-Superfamilie Domäne besitzt. Neben dieser Domäne ist ebenfalls eine Domäne einer Hydroxylase-Superfamilie vorhanden. Aufgrund dessen könnte dieses Gen für die Biosynthese der isolierten Spirotryprostatine verantwortlich sein. *NFIA_093380* codiert hingegen für ein rein hypothetisches Protein und *NFIA_093390* für ein *Ankyrin-repeat* Protein. Diese wiederholende Struktur beinhaltet zwei antiparallele Helices und einen beta-Hairpin, welche sich zu einer Superhelix zusammensetzen, wobei *NFIA_093390* vier aufeinanderfolgende

Ankyrin-repeats besitzt (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) (Rubtsov & Lopina 2000). Da *Ankyrin repeat* Proteine Protein-Protein-Interaktionen vermitteln und neben Verruculogen und Fumitremogin A auch Verruculgen TR-2 im Zuge dieser Arbeit aus *N. fischeri* isoliert werden konnte, dessen Biosynthese bisher ebenfalls nicht geklärt werden konnte, wäre es möglich, dass dieses *Ankyrin repeat* Protein zusammen mit dem hypothetischen Protein *NFIA_093380* für die Biosynthese von Verruculogen TR-2 verantwortlich sein könnte. Deshalb wurde beschlossen, diese drei Gene im Zuge dieser Arbeit zu untersuchen. Eine Übersicht der Intron-Exon-Struktur sowie die Proteinlängen und Massen der Gene bzw. Proteine sind in folgender Tabelle 3-29 zusammengefasst.

Tabelle 3-29: Intro-Exon-Struktur von *NFIA_093380*, *NFIA_093390* und *NFIA_093440*

| Gen | Länge [bp] | Exon [bp] | Intron [bp] | Protein | Länge [AS] | Molekulare Masse [kDa] |
|--------------------|------------|-----------|-------------|----------|------------|------------------------|
| <i>NFIA_093380</i> | 836 | 635 + 151 | 50 | EAW19375 | 261 | 27,82 |
| <i>NFIA_093390</i> | 1587 | 1587 | - | EAW19376 | 528 | 57,24 |
| <i>NFIA_093440</i> | 1167 | 1167 | - | EAW19378 | 388 | 44,91 |

Zusätzlich zu diesen drei Genen wurde ebenfalls mit *FtmO* und *FtmP* gearbeitet. Diese beiden Gene liegen neben dem Gencluster für die Biosynthese von Verruculogen wobei *FtmP* einen Abstand von 24 kb zu *FtmO* aufweist (siehe Abbildung 3-36).

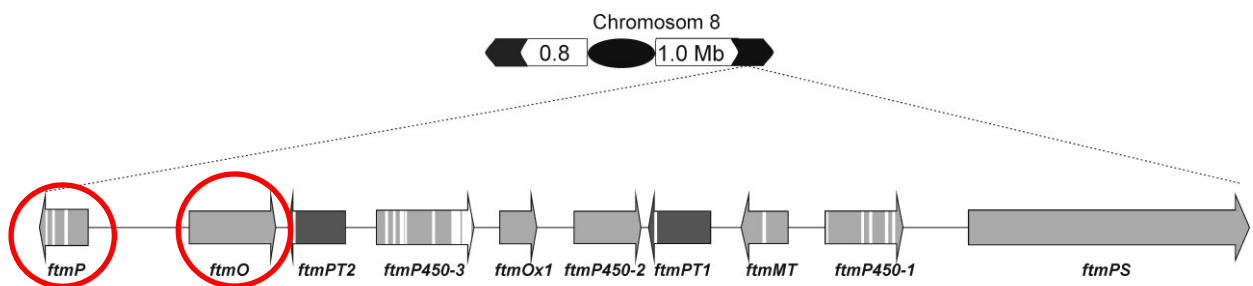


Abbildung 3-36: Verruculogen Gencluster von *N. fischeri* mit *FtmO* und *FtmP*

Die Funktion beider Gene wurde bereits von Dr. Marco Matuschek und Dr. Alexander Grundmann untersucht, konnte jedoch bisher nicht aufgeklärt werden. Kato *et al.* konnte, durch Inaktivierung von *FtmO* in *A. fumigatus* BBW939 2009 zeigen, dass *FtmO* keinen Einfluss auf die Biosynthese von Verruculogen hat. Aufgrund dessen wurde im Zuge dieser Arbeit untersucht, ob diese beiden Enzyme eventuell in der Biosynthese von der Spirotryprostatine eine Rolle spielen. Wobei *FtmO* (*AFUA_8G00260*) ebenfalls ein *Ankyrin*

repeat Protein ist und FtmP (*AFUA_8G00280*) Ähnlichkeiten mit einer short-chain Dehydrogenase aus *A. fumigatus* und *N. fischeri* NRRL181 sowie zu einer putativen Oxidoreduktase aus *Streptomyces avermitilis* aufweist.

3.4.2. Klonierung, Expression und Aufreinigung

3.4.2.1. Klonierung und Expression von *NFIA_093380*

Zur Amplifikation der beiden Exons von *NFIA_093380* wurde zunächst aus einer drei Tage alten Submerskultur in PD-Medium mit Hilfe des E.Z.N.A. Fungal RNA Miniprep Kit mRNA isoliert. Diese wurde direkt im Anschluss mit dem ProtoScript® M-MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit von Biolabs in cDNA umgeschrieben. Mit den Primern *NFIA_093380_for* und *NFIA_093380_rev* konnte sowohl mit der Taq-Polymerase als auch mit dem Expand High Fidelity Plus PCR System von Roche eine PCR Bande bei der erwarteten Höhe von ca. 786 bp amplifiziert werden. Die verwendeten PCR Bedingungen sind unter 2.7.4. beschrieben. Das erhaltene PCR Produkt wurde im Folgenden in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy kloniert und sequenziert. Die Sequenzierung bestätigte die Intron-Exon-Struktur, welche von NCBI vorhergesagt wurde, da genau die 50 bp des Erwartenden Introns nicht aus der cDNA mitamplifiziert wurden. Das in Abbildung 3-36. abgebildete Konstrukt erhielt die Bezeichnung pBW05. Es folgte die Umklonierung in das Expressionskonstrukt pQE60 mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen BamHI und NcoI. Das erhaltene Expressionskonstrukt erhielt die Bezeichnung pBW09 (Abbildung 3-37.).

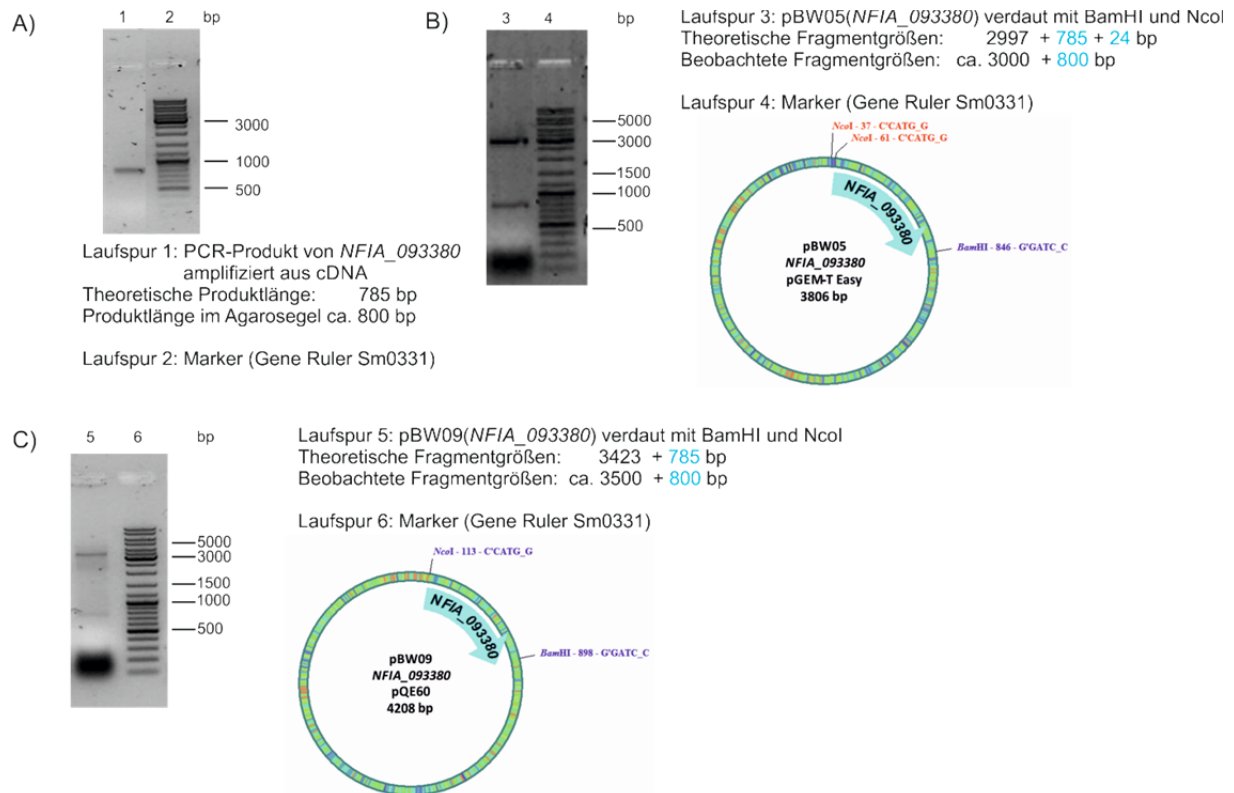


Abbildung 3-37: A) 1%iges Agarosegel mit dem amplifizierten PCR Produkt von *NFIA_093380* aus cDNA B) 1%iges Agarosegel zu der Klonierung von pBW05 mit der dazugehörigen Vektorkarte C) 1%iges Agarosegel zu der Klonierung von pBW09 mit der dazugehörigen Vektorkarte

Das Expressionskonstrukt wurde anschließend mittels Hitzeschocktransformation in *E. coli*-XL1 Blue, *E. coli*-SG13009 und *E. coli*-M15-Zellen transformiert. Es wurden verschiedene Expressionsbedingungen bei 20 °C, 30 °C, 37 °C mit 0,1 mM; 0,2 mM; 0,5 mM oder 1mM IPTG für 6 bzw. 16 h getestet. Das erwartete Protein EAW19375 besitzt ein Molekulargewicht von 27,82 kDa, zusammen mit den 6 Histidinresten im Expressionskonstrukt pQE60 (EAW19375-His₆) erwartet man eine Bande bei 28,6 kDa auf der SDS-PAGE. Unter einigen Bedingungen konnte an dieser Stelle eine Band detektiert werden (siehe Abbildung 3-37.), da jedoch *E. coli* selber für ein ca. 28 kDa großes histidinreiches Protein kodiert (SlyD) (Wülfing *et al.*, 1994), wurde zur Kontrolle, ob es sich bei dieser Bande tatsächlich um EAW19375-His₆ handelt, eine Western-Blot-Analyse durchgeführt (siehe Abbildung 3-38.).

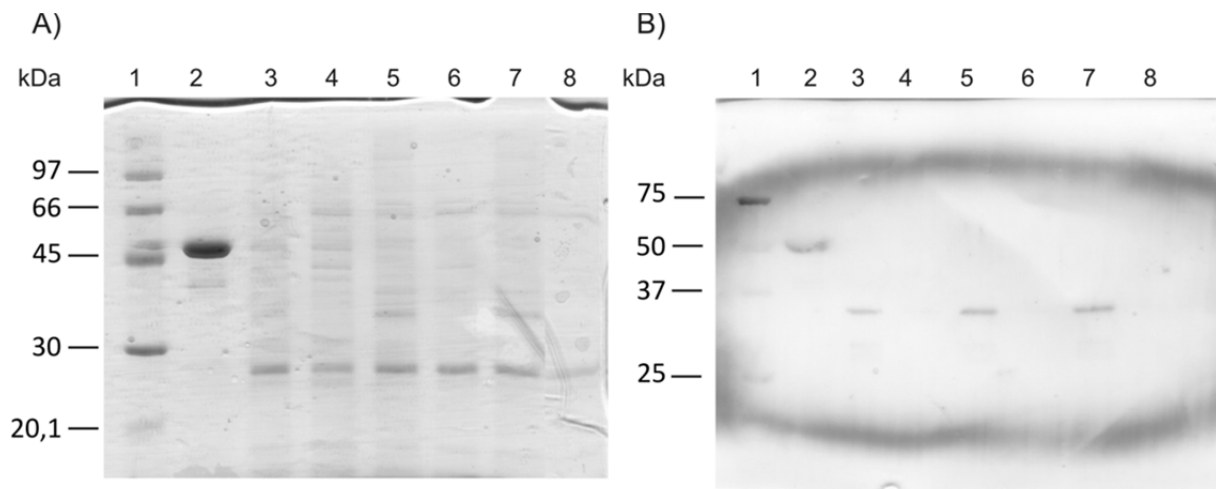


Abbildung 3-38: Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose von EAW19375 (pBW09) in *E. coli* XL1 Blue bei 30 °C für 6 h bzw. 16 h A) SDS-PAGE B) Western-Blot. Spur 1: A) Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis (GE Healthcare) B) Precision Plus Protein™ Standards (Bio-Rad)/ Spur 2: FtmPT1 (positiv Kontrolle)/ Spur 3: EAW19375; 0,1mM IPTG; 6 h/Spur 4: EAW19375; 0,1mM IPTG; 16h/ Spur 5: EAW19375; 0,5mM IPTG; 6 h/ Spur 6: EAW19375; 0,5mM IPTG; 16 h/Spur7: EAW19375; 1mM IPTG; 6 h/ Spur 8: EAW19375; 1mM IPTG; 16 h

Im Western-Blot ist neben der Positivkontrolle FtmPT1 bei den Expressionsbedingungen mit einer Expressionszeit von 6 h eine Bande auf der Membran bei ca. 32-33 kDa erkennbar. Da das erwartete Protein EAW19375-His₆ eine Größe von 28,6 kDa aufweisen soll, wurde zur Bestätigung der Identität des Proteins unter Hilfe von Herrn Dr. Linne eine Massenanalyse dieser Banden wie unter 2.12.13. beschrieben durchgeführt. Diese bestätigte, dass es sich tatsächlich um das erwartete Protein EAW19375-His₆ handelt.

3.4.2.2. Klonierung und Expression von *NFIA_093390*

Das Gen *NFIA_093390* wies laut NCBI und dem Broad Institute keine Introns auf, aufgrund dessen wurde zunächst die genomische DNA von *N. fischeri* NRRL181 aus einer drei Tage alten Submerskultur (PD-Medium) isoliert. Mit den Primern *NFIA_093390_for* und *NFIA_093390_rev* konnte ein 1587 bp großes PCR Fragment erhalten werden. Dieses wurde im Folgenden in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde pBW20 genannt und zur Kontrolle eventueller Mutationen erfolgte eine Sequenzierung. Mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Nco*I wurde *NFIA_093390* in den Expressionsvektor pQE60 umkloniert (pBW22). Die beiden Konstrukte mit den relevanten Restriktionsschnittstellen sind in folgender Abbildung 3-39 dargestellt.

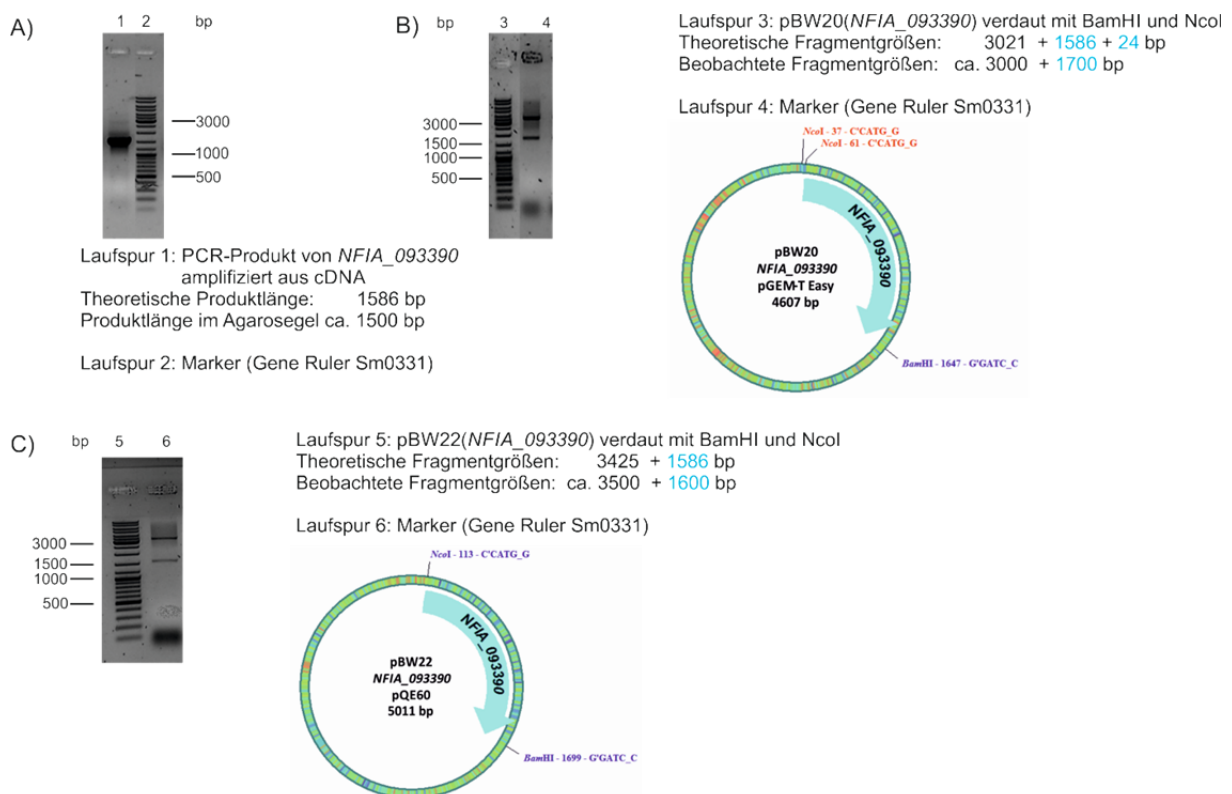


Abbildung 3-39: A) 1%iges Agarosegel mit dem amplifizierten PCR Produkt von *NFIA_093390* aus cDNA B) 1%iges Agarosegel zu der Klonierung von pBW20 mit der dazugehörigen Vektorkarte C) 1%iges Agarosegel zu der Klonierung von pBW22 mit der dazugehörigen Vektorkarte

Das Expressionskonstrukt pBW22 wurde anschließend in *E. coli* XL1 Blue, *E. coli*-SG13009 und *E. coli*-M15-Zellen transformiert. Die Expressionsbedingungen wurden optimiert und vier der getesteten Bedingungen sind in folgender Abbildung 3-40 dargestellt.

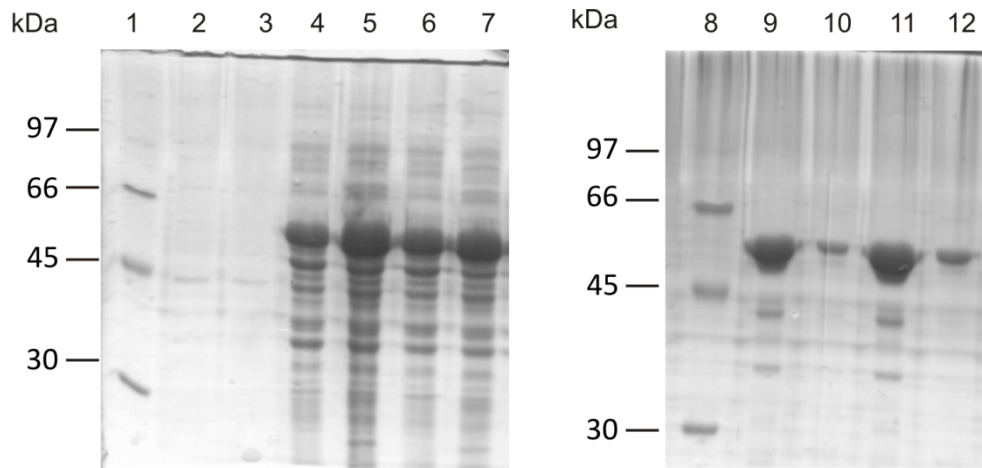


Abbildung 3-40: SDS-PAGE der Aufreinigung von EAW19376 (pBW22) in *E. coli* SG13009 und *E. coli* M15 bei 30 °C bzw. 20 °C für 16 h und Induktion mit 0,5 mM IPTG. Spur 1 und 8: Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis (GE Healthcare)/ Spur 2: Expressionsstatus vor der Induktion (M15) /Spur 3: Expressionsstatus vor der Induktion (SG13009)/ Spur 4: Gesamtprotein nach 16 h Induktion bei 20 °C (M15)/ Spur 5: Gesamtprotein nach 16 h Induktion bei 30 °C (M15)/ Spur 6: Gesamtprotein nach 16 h Induktion bei 20 °C (SG13009)/ Spur 7: Gesamtprotein nach 16 h Induktion bei 30 °C (SG13009)/ Spur 9: Reinigungsgrad nach der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose (20 °C,M15)/ Spur 10: Reinigungsgrad nach der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose (30 °C,M15)/ Spur 11: Reinigungsgrad nach der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose (20 °C,SG13009)/ Spur 12: Reinigungsgrad nach der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose (30 °C,SG13009)

Auf der erwarteten Höhe von ca. 58 kDa ist unter allen hier dargestellten Bedingungen eine Bande nach der Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose zu erkennen. Die höchste Ausbeute erreichte man mit den Zelllinien *E. coli* SG13009 und *E. coli* M15 bei einer Expressionstemperatur von 20 °C über 16 h. Vor der Induktion mit 0,5 mM IPTG wurden die Zellen dabei bei 37 °C bis zu einer OD_{600} 0,6 angezogen. Unter der Bedingung von Laufspur 9 aus Abbildung 3-40 konnte eine Ausbeute von ca. 5,6 mg pro Liter Kultur erzielt werden.

3.4.2.3. Klonierung und Expression von *NFIA_093440*

Das Gen des potenziellen Membranproteins EAW19378, *NFIA_093440*, wurde zunächst, da es laut NCBI keine Introns enthält, aus der bereits vorher isolierten gDNA mit den Primern *NFIA_093440_for* und *NFIA_093440_rev* mittels PCR amplifiziert. Das PCR Produkt des Expand High Fidelity Plus PCR System von Roche wurde in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy kloniert. Das erhaltene Konstrukt wurde durch Sequenzierung bestätigt und pBW01 genannt. Mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Sp*HI wurde das Insert in den Expressionsvektor pQE70 umkloniert. Die beiden Vektorkarten sind in folgender Abbildung 3-41 dargestellt.

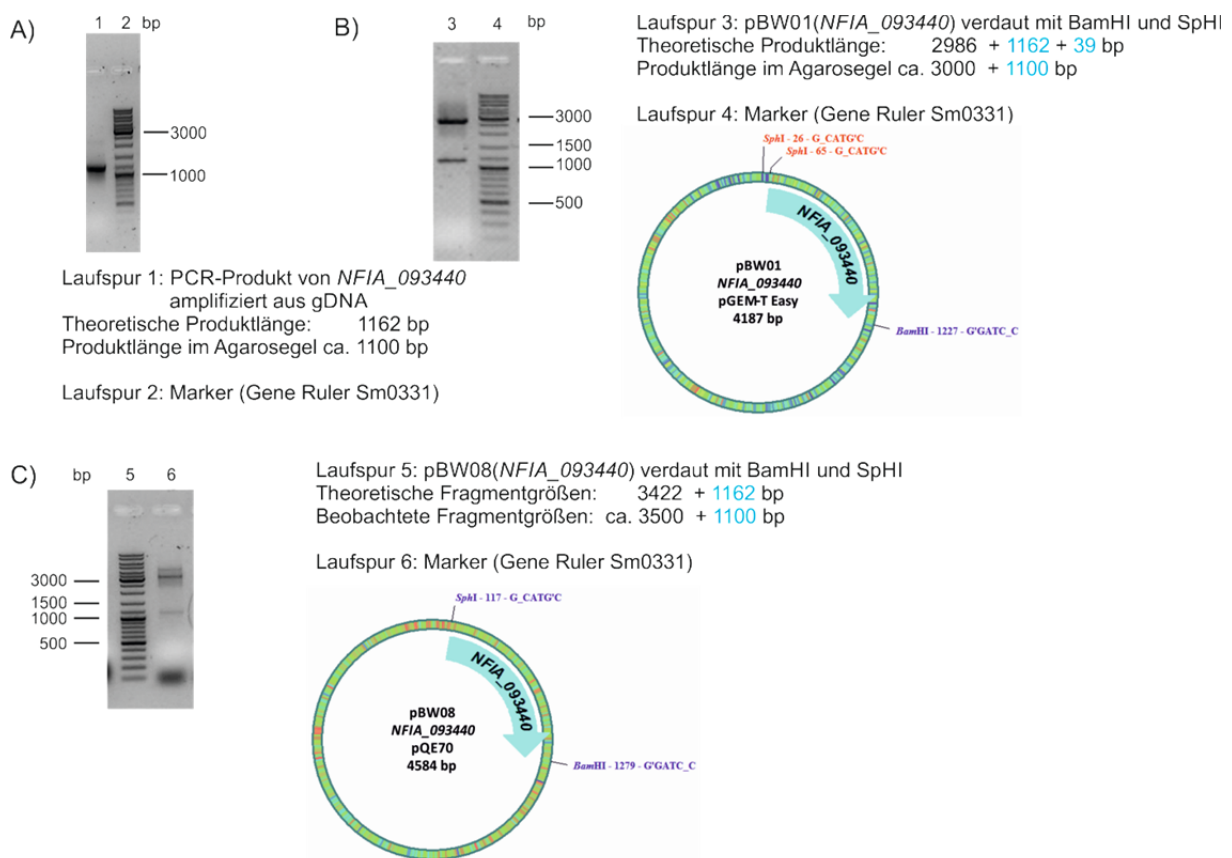


Abbildung 3-41: A) 1%iges Agarosegel mit dem amplifizierten PCR Produkt von *NFIA_093440* aus gDNA B) 1%iges Agarosegel zu der Klonierung von pBW01 mit der dazugehörigen Vektorkarte C) 1%iges Agarosegel zu der Klonierung von pBW08 mit der dazugehörigen Vektorkarte

Das Expressionskonstrukt wurde daraufhin in *E. coli*-XL1 Blue-Zellen mittels Hitzeschocktransformation eingebracht. Da es sich bei EAW19378 laut SOSUI um ein

Membranprotein mit einer Transmembrandomäne handelt, wurde EAW19378 wie unter 2.8.2. und 2.8.3. beschrieben aufgereinigt. Es wurden verschiedene Expressionsbedingungen getestet. Bei einigen Bedingungen konnte eine Bande bei der erwarteten Größe des EAW19378-His₆ Proteins von 45,7 kDa auf der SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung beobachtet werden. Um die Identität zu bestätigen, wurde eine Western-Blot-Analyse mit einem Anti-Histidine-Tagged Antikörper durchgeführt. Außer der Positivkontrolle FtmPT1 konnte jedoch keine Bande auf der PVDF Membran detektiert werden. Daraufhin wurde beschlossen, das Gen in den pHis8 Vektor umzuklonieren, der anders als der pQE70 Vektor keinen T5 sondern einen T7 Promotor besitzt. Gleichzeitig sollte versucht werden das Protein in der Hefe *S. cerevisiae* mittels des pYES2/NT C Vektors zu gewinnen.

In folgender Abbildung 3-41 ist die Umklonierung von *NFIA_093440* in den pHis8 Vektor mit den Primern *NFIA_093440-for1* und *NFIA_093440-rev1* zu sehen. Diese enthalten die Schnittstellen BamHI und HindIII, da jedoch anders als beim pQE70 Vektor, im pHis8 Vektor der Histidinrest N-terminal angefügt wird, wurde das Startcodon entfernt und dafür das Stopcodon wieder eingefügt. Das erhaltene PCR Produkt, basierend auf dem *template* pBW01 mit den beiden neuen Schnittstellen, wurde in den pGEM-T Easy Vektor kloniert. Das Konstrukt wurde sequenziert und als pBW12 bezeichnet (siehe Abbildung 3-42). Mit Hilfe der neuen Restriktionsschnittstellen wurde das Insert nun in den pHis8 Vektor umkloniert. Auch dieses Konstrukt wurde mittels Sequenzierung überprüft und pBW14 genannt (siehe Abbildung 3-42).

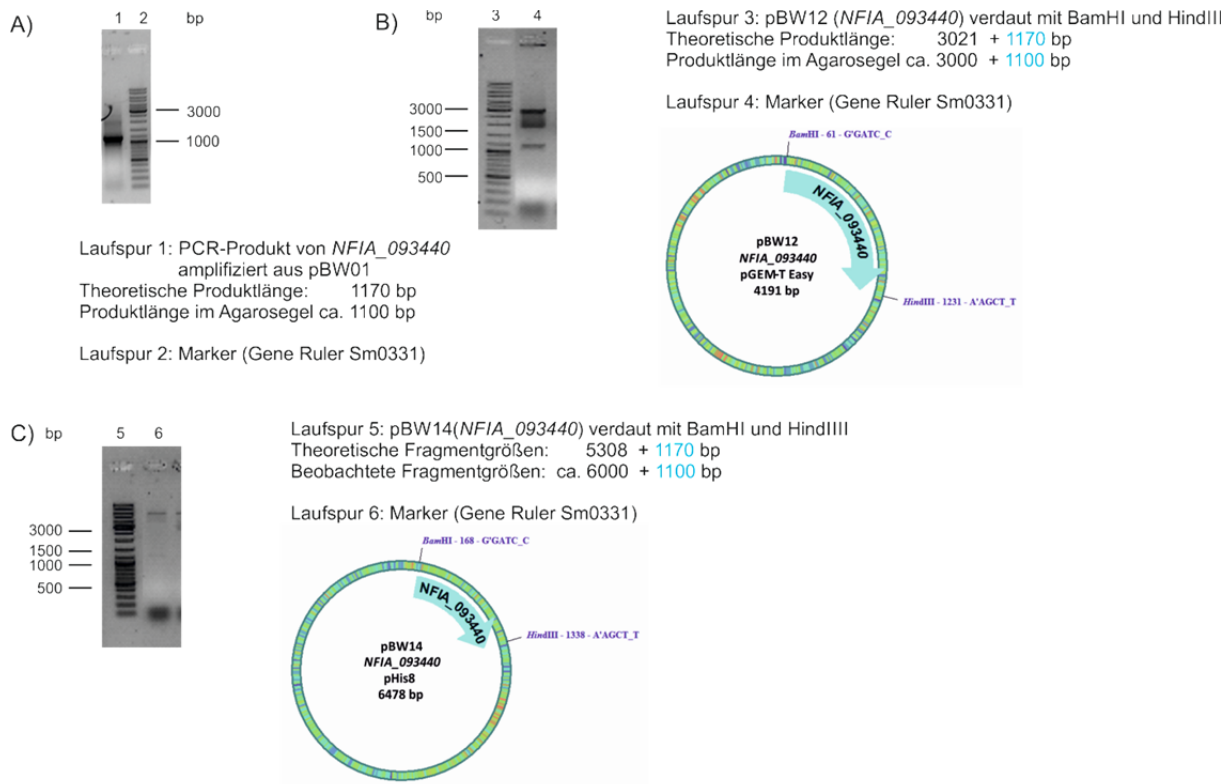


Abbildung 3-42: A) 1%iges Agarosegel mit dem amplifizierten PCR Produkt von *NFIA_093440* aus pBW01 B) 1%iges Agarosegel zu der Klonierung von pBW12 mit der dazugehörigen Vektorkarte C) 1%iges Agarosegel zu der Klonierung von pBW14 mit der dazugehörigen Vektorkarte

Gleichzeitig wurde *NFIA_093440* mit den Primern *NFIA_093440_for1* und *NFIA_093440_rev2* aus pBW01 amplifiziert. Das erhaltene PCR Produkt mit den beiden neuen Restriktionsschnittstellen BamHI und XbaI wurde wieder in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy kloniert. Der pYes2/NT C Vektor besitzt zwei Polyhistidin Regionen, einen N-terminalen und einen C-terminalen. Die beiden Schnittstellen wurden so ausgewählt, dass hier der N-terminale Polyhistidintag zur Aufreinigung verwendet werden konnte. Da XbaI nur an unmethylierter DNA schneidet, wurde das erhaltene Plasmid pBW13 mittels Elektroporation in den elektrokompenten nicht methylierenden *E. coli* Stamm ET12567 transformiert und aufgereinigt. Die beiden Konstrukte mit den relevanten Restriktionsschnittstellen sind in folgender Abbildung 3-43 dargestellt.

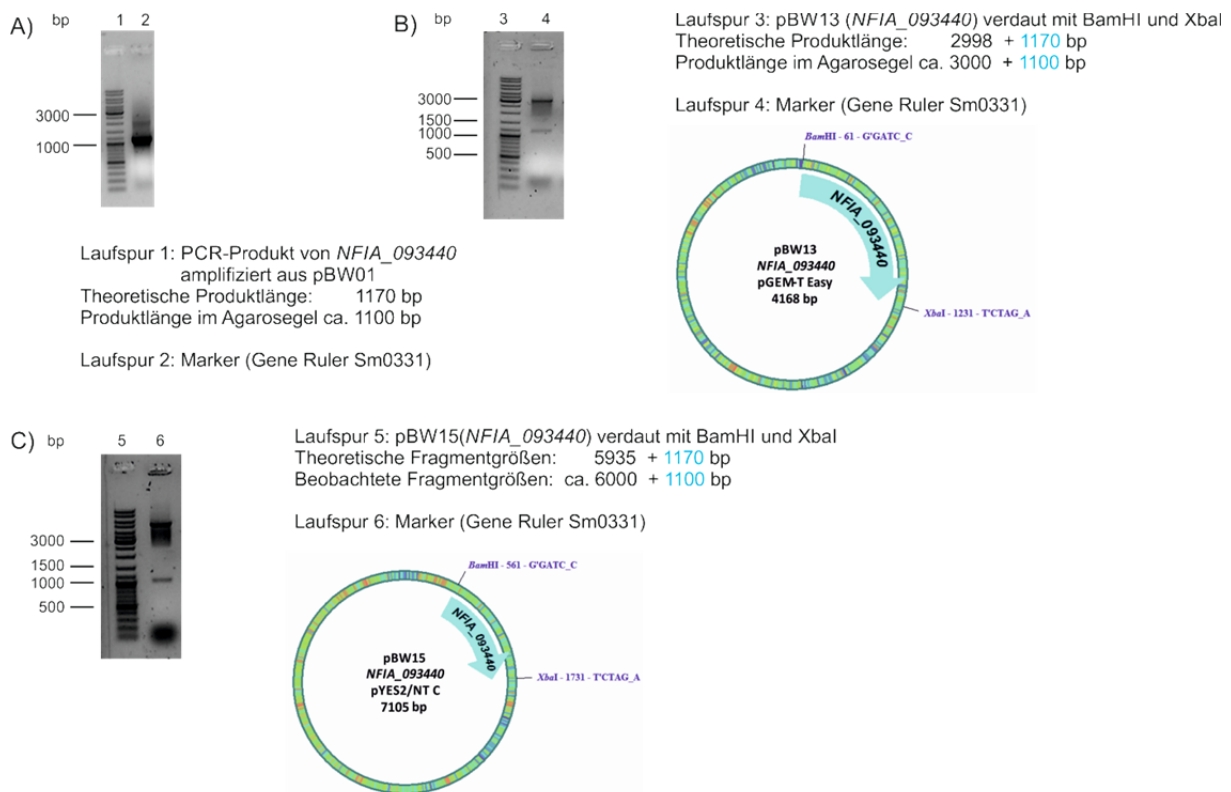


Abbildung 3-43: A) 1%iges Agarosegel mit dem amplifizierten PCR Produkt von *NFIA_093440* aus pBW01 B) 1%iges Agrosegel zu der Klonierung von pBW13 mit der dazugehörigen Vektorkarte C) 1%iges Agarosegel zu der Klonierung von pBW15 mit der dazugehörigen Vektorkarte

Das erhaltene pYES2/NT C Konstrukt pBW15 wurde im Folgenden mit dem S. c. EasyCompTM Transformation Kit nach Herstellerangaben in kompetente *S. cerevisiae* INVSc1-Zellen transformiert. Die Transformation wurde mittels Colony-PCR mit den Primern *NFIA_093440_for1* und *NFIA_093440_rev2* überprüft. Die Überproduktion des His₆-EAW19378 Proteins wurde wie unter 2.8.3. beschrieben durchgeführt. Die erhaltenen Proben, Gesamtprotein 24 h nach Induktion, lösliche Proteinfraction nach Zentrifugation, entsalzter löslicher Proteinanteil nach der Zentrifugation (NAP), das in NAP-Puffer bzw. Breaking-Puffer zurückgelöste Pellet nach der Ultrazentrifugation (UZP) und der Überstand nach der Ultrazentrifugation (UZÜ) wurden im nachfolgenden mittels Western-Blot analysiert. Zunächst wurden die Proben für 10 min bei 99 °C denaturiert, bevor sie auf das SDS-Gel aufgetragen wurden. Der erhaltene Western-Blot ist in folgender Abbildung 3-44 dargestellt.

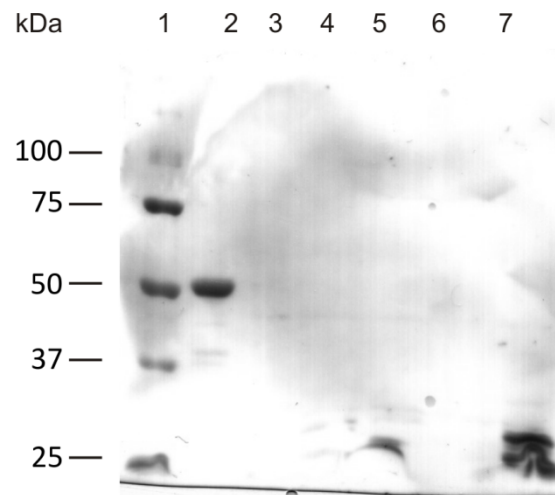


Abbildung 3-44: Western-Blot von His₆-EAW19378 nach Aufreinigung in *S. cerevisiae* Spur 1: Precision Plus ProteinTM Standards (Bio-Rad)/ Spur 2: FtmPT1 (positiv Kontrolle)/ Spur 3: Gesamtprotein 24 h nach Induktion/ Spur 4: lösliche Proteinfraction nach Zentrifugation/ Spur 5: entsalzter löslicher Proteinanteil nach der Zentrifugation (NAP)/ Spur 6: Überstand nach der Ultrazentrifugation (UZÜ)/ Spur 7: Pellet nach der Ultrazentrifugation (UZP)

In der NAP-Fraktion und im Pellet nach der Ultrazentrifugation (UZP) konnte auf einer Höhe von ca. 30 kDa eine Bande detektiert werden. Das erwartete His₆-EAW19378 Protein weist jedoch eine Größe von 48,3 kDa auf. Die detektierte Bande läuft folglich deutlich niedriger als erwartet. Dies könnte daran liegen, dass die Proben vorher ca. 10 min bei 99 °C gekocht wurden. Da Membranproteine meist hydrophober als lösliche Proteine sind, können sie mehr SDS binden und laufen dadurch schneller. Um dies zu bestätigen wurde der Western-Blot mit ungekochten Proben wiederholt (siehe Abbildung 3-45).

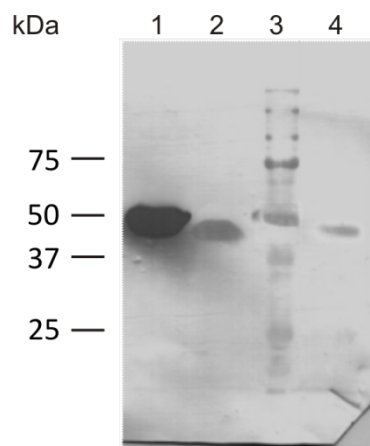


Abbildung 3-45: Western-Blot von His₆-EAW19378 nach Aufreinigung in *S. cerevisiae* Spur 1: FtmPT1 (positiv Kontrolle)/ Spur 2: entsalzter löslicher Proteinanteil nach der Zentrifugation (NAP)/ Spur 3: Precision Plus ProteinTM Standards (Bio-Rad)/ Spur 4: Pellet nach der Ultrazentrifugation (UZP)

Die ungekochten Proben zeigten eine deutliche Bande auf der PVDF-Membran in der erwarteten Höhe von ca. 48 kDa. Da mit Hilfe von *S. cerevisiae* das Membranprotein His₆-EAW19378 aufgereinigt werden konnte, wurde die Expression von pBW14 in *E. coli*-BL21 (DE3)-Zellen nicht weiter verfolgt.

3.4.3. Überproduktion von FtmO und FtmP

Zur Expression von FtmO wurde das Expressionskonstrukt pMM007 von Herrn Dr. Marco Matuschek zur Verfügung gestellt. Die bereits optimierten Expressionsbedingungen in *E. coli*-XL1 Blue-Zellen wurden übernommen. Dabei wurden die Zellen bei 22 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert und die Expression für 15 h bei 22 °C mit 0,1 mM IPTG induziert. Die Elutionsfraktion nach der Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose wies, trotz optimierter Bedingungen, mehrere Verunreinigungen auf. Jedoch ist auf der erwarteten Höhe von 73,4 kDa eine Bande zu erkennen. Zur Bestätigung, dass es sich um das erwartete FtmO-His₆ Protein handelt, wurde im Folgenden eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Die SDS-PAGE und die PVDF-Membran des Western-Blots mit der erwarteten Bande auf einer Höhe von ca. 74 kDa sind in Abbildung 3-46. dargestellt.

Zur Expression von FtmP wurde das Expressionskonstrukt pAG016 von Dr. Alexander Grundmann zur Verfügung gestellt. Hier wurden ebenfalls die bereits optimierten Bedingungen zur Expression übernommen. So erfolgte die Expression in XL1 Blue-Zellen bei 22 °C über 16 h. Die Induktion erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0,6 mit 0,1 mM IPTG. In der Elutionsfraktion nach der Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose konnte eine deutliche Bande auf der erwarteten Höhe von 37,1 kDa detektiert werden. Insgesamt konnten ungefähr 3,8 mg FtmP-His₆ pro Liter Kultur aufgereinigt werden. Die SDS-PAGE und die PVDF-Membran des durchgeführten Western-Blots sind ebenfalls in folgender Abbildung 3-46. dargestellt.

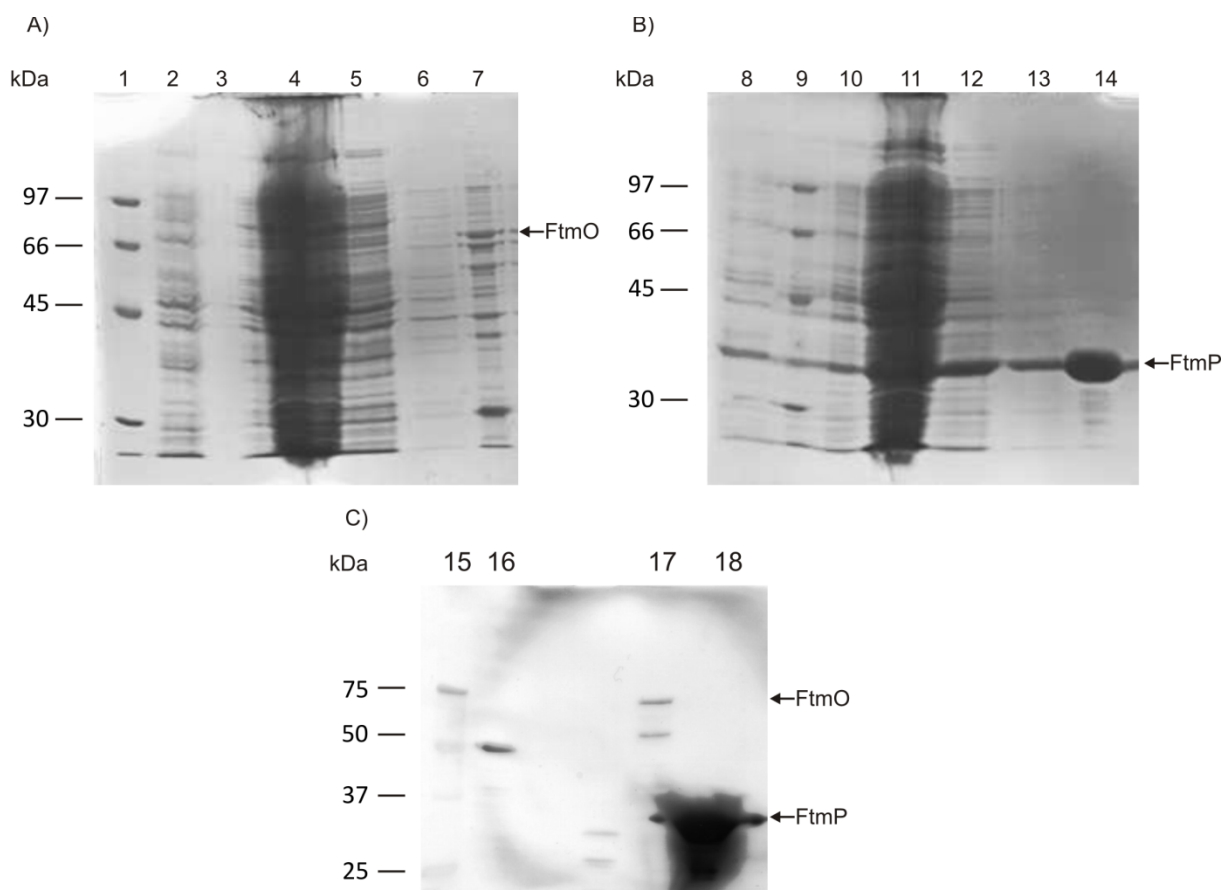


Abbildung 3-46: SDS-PAGE vor und nach Reinigung von A) FtmO bzw. B) FtmP Spur 1 und 9: Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis (GE Healthcare)/ Spur 2 und 8: Expressionsstatus vor der Induktion/ Spur 3 und 10: Gesamtprotein nach Induktion/ Spur 4 und 11: Durchfluss/ Spur 5 und 12: Waschfraktion 1/ Spur 6 und 13: Waschfraktion 2/ Spur 7 und 14: Reinigungsgrad nach der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose und **C) Western-Blot von FtmO und FtmP** nach Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose Spur 15: Precision Plus Protein™ Standards (Bio-Rad)/ Spur 16: FtmPT1 (positive Kontrolle)/ Spur 17: FtmO/ Spur 18: FtmP

3.4.4. Versuche zum Nachweis der enzymatischen Aktivität von EAW19375, EAW19376, EAW19378, FtmO und FtmP

Da im Zuge dieser Arbeit ein Cyclotryprostatin (Verruculogen TR-2), zwei Spirotryprostatine (Spirotryprostatin A, 6-Methoxyspirotryprostatin B) und Substanz 15 aus dem Ascomyceten *N. fischeri* isoliert werden konnten, deren Biosynthese bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht aufgeklärt werden konnten, wurde vermutet, dass FtmO oder FtmP, welche in der Nähe des Verruculogen-Cluster liegen, sowie EAW19375, EAW19376, EAW19378, welche zu dem neuen potenziellen Cluster bei FtmPT3 gehören, für deren Biosynthese verantwortlich sein könnten. So wurden verschiedene Enzymassays durchgeführt, der Standardansatz ist unter 2.8.9. beschrieben. Als Substrate wurden Tryprostatin B, Fumitremorgin C und

12,13-Dihydroxyfumitremorgin C eingesetzt. Die Assays wurden mit jedem Enzym einzeln, in zweier und dreier-Kombinationen oder mit allen Enzymen zusammen durchgeführt. Auch die Cofaktoren wurden in ihrer Konzentration (1 mM oder 5 mM) sowie deren Zusammensetzung variiert (siehe 2.8.9.). Eine Zusammenfassung der durchgeführten Enzymassays ist in folgender Tabelle 3-30 dargestellt. Die Assays wurden mittels HPLC analysiert (siehe 2.12.1) und untersucht, es konnte jedoch unter keiner der getesteten Bedingungen eine Umsetzung detektiert werden.

Tabelle 3-30: Übersicht der Durchgeführten Enzymassays. Die Enzyme sind folgendermaßen abgekürzt: EAW19375 (A), EAW19376 (B), EAW19378 (C), FtmO (D), FtmP (E). Die Cofaktoren sind folgendermaßen Abgekürzt: NAD +NADP+FAD+FMN (a), NADH + NADPH + FMN + FAD (b)

| Enzyme (Cofaktoren) | Substrat | | |
|--------------------------|----------------|-----------------|--------------------------------|
| | Tryprostatin B | Fumitremorgin C | 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C |
| A (a,b) | ✓ | ✓ | ✓ |
| B (a,b) | ✓ | ✓ | ✓ |
| C (a,b) | ✓ | ✓ | ✓ |
| D (a,b) | ✓ | ✓ | ✓ |
| E (a,b) | ✓ | ✓ | ✓ |
| A + B (a, b) | ✓ | ✓ | ✓ |
| A + C (a, b) | ✓ | ✓ | ✓ |
| B + C (a, b) | ✓ | ✓ | ✓ |
| D + E (a, b) | ✓ | ✓ | ✓ |
| A + B + C (a, b) | ✓ | ✓ | ✓ |
| A + B + C + D + E (a, b) | ✓ | ✓ | ✓ |

3.4.5. Zufütterung von Tryprostatin B

Da keine der klonierten Gene bzw. getesteten Proteine eine Umsetzung zu Spirotryprostatin A, 6-Methoxyspirotryprostatin B, Substanz 15 oder Verruculogen TR-2 aufwiesen, sollte im Folgenden untersucht werden, ob diese vier Substanzen überhaupt biosynthetisch aus Tryprostatin B hervorgehen. Da zwei der vier Substanzen aus Kultivierungsbedingung 3 (Emerskultur, PD-Medium, 37 °C, 120 rpm) isoliert wurden, wurde diese Bedingung für dieses Experiment ausgewählt. Hierfür wurden zwei 50 ml Submerskulturen mit PD-Medium in 250 ml Erlenmeyerkolben mit einem Mycelagarstück (Ø 5 mm) einer gut bewachsenen *N. fischeri* NRRL181 Agarplatte (HA-Medium) angeimpft. Nach

drei Tagen wurde einem Kolben 0,1 mM Tryprostatin B (1,9 mg) in Ethanol gelöst hinzugegeben. Nach insgesamt 14 Tagen wurden die Kulturen wie unter 2.10.2. beschrieben aufgereinigt und mittels HPLC analysiert. In folgender Abbildung 3-47 sind die Kulturfiltratextrakte im Vergleich zu den isolierten Verbindungen dargestellt.

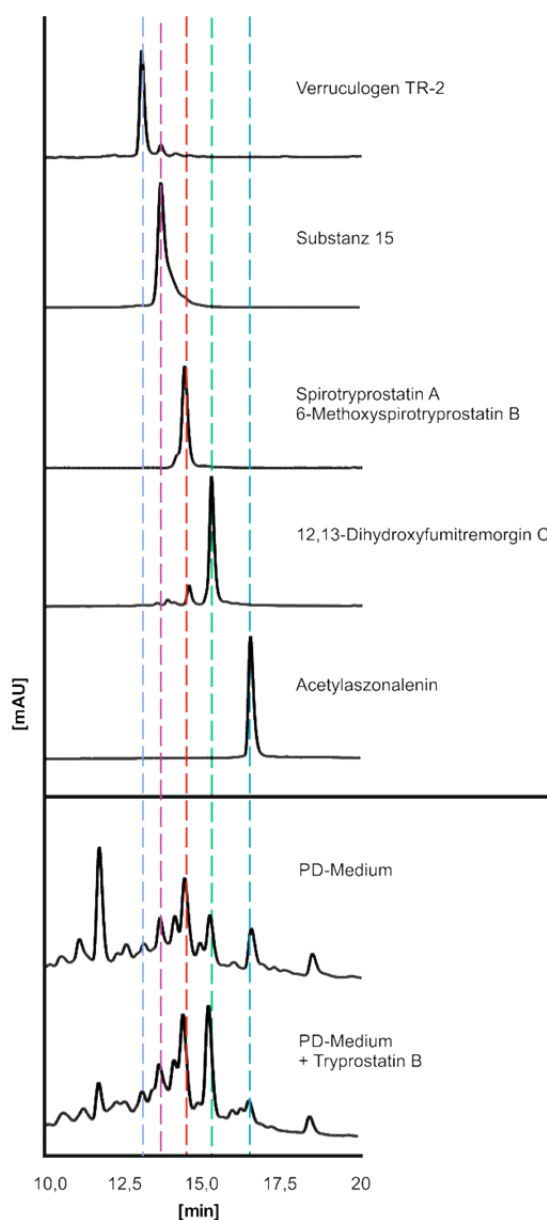


Abbildung 3-47: HPLC-Chromatogramme der Kulturfiltratextrakte des Zufütterungsversuches bei 296 nm

Aus dieser Kultivierungsbedingung 3 (Emerskultur, PD-Medium, 37 °C, 120 rpm) wurden neben Spirotryprostatin A und 6-Methoxyspirotryprostatin B auch 12,13-Dihydroxyfomitremorgin C und Acetylaszonalenin isoliert. Mittels HPLC-MS konnten aber auch Verruculogen TR-2 und Substanz 15 detektiert werden. Acetylaszonalenin entstand

dabei biosynthetisch nicht aus Tryprostatin B, und 12,13-Dihydroxyfomitremorgin C ist nachweislich an der Biosynthese von Verruculogen bzw. Fomitremorgin A beteiligt (siehe 1.3.3.). In Folge dessen erwartet man, dass im Kulturfiltrat nach der Zufütterung von Tryprostatin B weniger Acetylaszonalenin aber mehr 12,13-Dihydroxyfomitremorgin C im Kulturfiltrat enthalten ist. In obiger Abbildung 3-47. kann man ebendies erkennen, um jedoch sicher zu gehen, dass diese Vermutung auch zutrifft, wurde von Herrn Dr. Linne eine HPLC-MS Analyse dieser Kulturfiltratextrakte durchgeführt. Da die Extrakte in einer definierten Konzentration von 20 µg/µl zurückgelöst wurden und von den gesuchten Substanzen Standards zur Verfügung standen, konnten die entsprechenden Massenpeaks integriert und verglichen werden. Die entsprechenden Chromatogramme sind im Anhang unter 6.8. zu finden. Auf diese Weise konnte bestätigt werden, dass nach der Zufütterung von Tryprostatin B wie erwartet rund 60% mehr 12,13-Dihydroxyfomitremorgin C und rund 65% weniger Acetylaszonalenin produziert worden sind. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass neben 12,13-Dihydroxyfomitremorgin C auch rund 60% mehr Spirotryprostatin A und 6-Methoxysirotryprostatin B produziert wurden. Von Verruculogen TR-2 wurde nach der Zufütterung von Tryprostatin B rund 80% mehr produziert, von Substanz 15 jedoch wurde nach der Zufütterung rund 40% weniger produziert. Dies spricht dafür, dass Spirotryprostatin A, 6-Methoxysirotryprostatin B und Verruculogen TR-2 tatsächlich biosynthetisch aus Tryprostatin B entstehen. Substanz 15 hingegen wird laut diesen Ergebnissen nicht biosynthetisch aus Tryprostatin B synthetisiert.

3.5. In vivo Produktion von Deoxybrevianamid E in *A. nidulans* TN02A7

3.5.1. Einleitung

Ziel dieses Projektes war die Coexpression des Prenyltransferasegens *brePT* aus *A. versicolor* NRRL573 zusammen mit dem NRPS-Gen *ftmPS* aus *N. fischeri* in *A. nidulans* TN02A7. *BrePT* ist ein orthologes Gen zum Prenyltransferasegen *notF* aus *Aspergillus* sp. MF297-2 und katalysiert eine reverse C2-Prenylierung an verschiedenen tryptophanhaltigen zyklischen Dipeptiden, wobei Brevianamid F (*cyclo*-L-Trp-L-Pro), das FtmPS Produkt, das am besten umgesetzte Substrat darstellt. (siehe Abbildung 3-48) (Yin *et al.*, 2013).

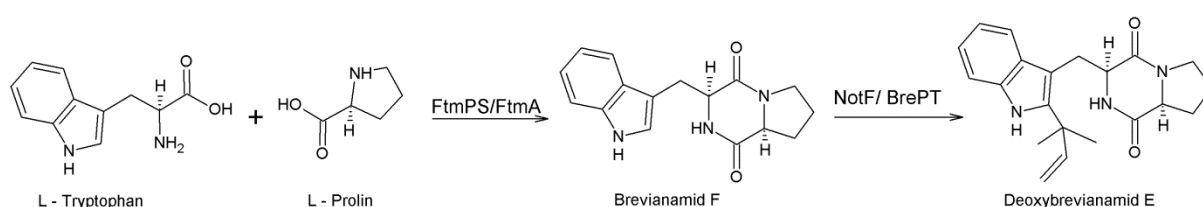


Abbildung 3-48: Biosynthese von Deoxybrevianamid E

Nach erfolgreicher Klonierung des Prenyltransferasegens *brePT* in das von Carsten Wunsch bereitgestellte pCaW34-Konstrukt und Transformation in den, ebenfalls von Carsten Wunsch bereitgestellten, Transformanten *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*), sollte der erhaltene Transformant kultiviert und dessen Sekundärmetabolite auf die Produktion von Deoxybrevianamid E untersucht werden.

3.5.2. Klonierung von *brePT* in das pQE60-Konstrukt pCaW34

Zunächst sollte ein Konstrukt basierend auf dem Expressionsvektor pQE60 mit konstitutivem Promotor, dem Prenyltransferasegen *brePT*, Terminator sowie einem Selektionsmarker erstellt werden. Hierfür wurde von Herrn Carsten Wunsch das Konstrukt pCaW34, welches das Prenyltransferasegen *cdpNPT*, den Selektionsmarker *pyroA*, einen Promotor *gpdA* und den Terminator *trpC_{term}* enthält, zur Verfügung gestellt (siehe Abbildung 78). Durch Frau Dr. Kathrin Mundt wurde zusätzlich das pGEM-T Easy Konstrukt pKM32, welches das Prenyltransferasegen *cdpNPT* und einen Teil des Terminators *trpC_{term}*, herausgeschnitten mit NcoI aus pCaW34, enthält zur Verfügung gestellt. Aus diesem sollte nun das

Prenyltransferasegen *cdpNPT* mit dem Prenyltransferasegen *brePT* ersetzt werden. Hierfür musste *brePT* zunächst mit neuen Schnittstellen, NcoI und BglII, versehen werden. Dies erfolgte mittels Standard PCR Ansatz (siehe 2.7.4.). Als *template* diente das pSY1-Konstrukt, welches von Frau Suqin Yin im Zuge ihrer Masterarbeit angefertigt wurde, als Primer wurden BrePT_for_3 und BrePT_rev_3 eingesetzt. Das PCR Produkt wurde in Folge dessen in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy kloniert. Das erhaltene Konstrukt wurde pBW21 genannt. Da pKM32 zwei NcoI Schnittstellen und BglII zwei Mal intern in *brePT* schneidet, folgte eine partielle Restriktion mit NcoI und BglII (siehe 2.7.8.) von pBW21 und pKM32 (siehe Abbildung 3-48.). Da jedoch, wie sich später herausstellte, *brePT* in pBW21 in falscher Orientierung integriert wurde, entstand eine zweite NcoI Schnittstelle direkt neben der BglII Schnittstelle in pBW21 (siehe Abbildung 3-50.). Deswegen konnte während der partiellen Restriktion keine Trennung zwischen dem NcoI-NcoI und NcoI-BglII Fragment erfolgen. Deshalb wurde statt dem NcoI-BglII Fragment aus pBW21 das NcoI-NcoI Fragment in das ebenfalls durch partielle Restriktion geöffnete pKM32-Konstrukt integriert. Dies hatte zur Folge, dass der Teil des *trpC_{term}* Terminators, welcher aus pCaW34 mit *cdpNPT* herausgeschnitten wurde, nun in dem erhaltenen Konstrukt pBW23 fehlt. In den beiden Abbildungen 3-49 und 3-50 ist dies noch einmal bildlich dargestellt.

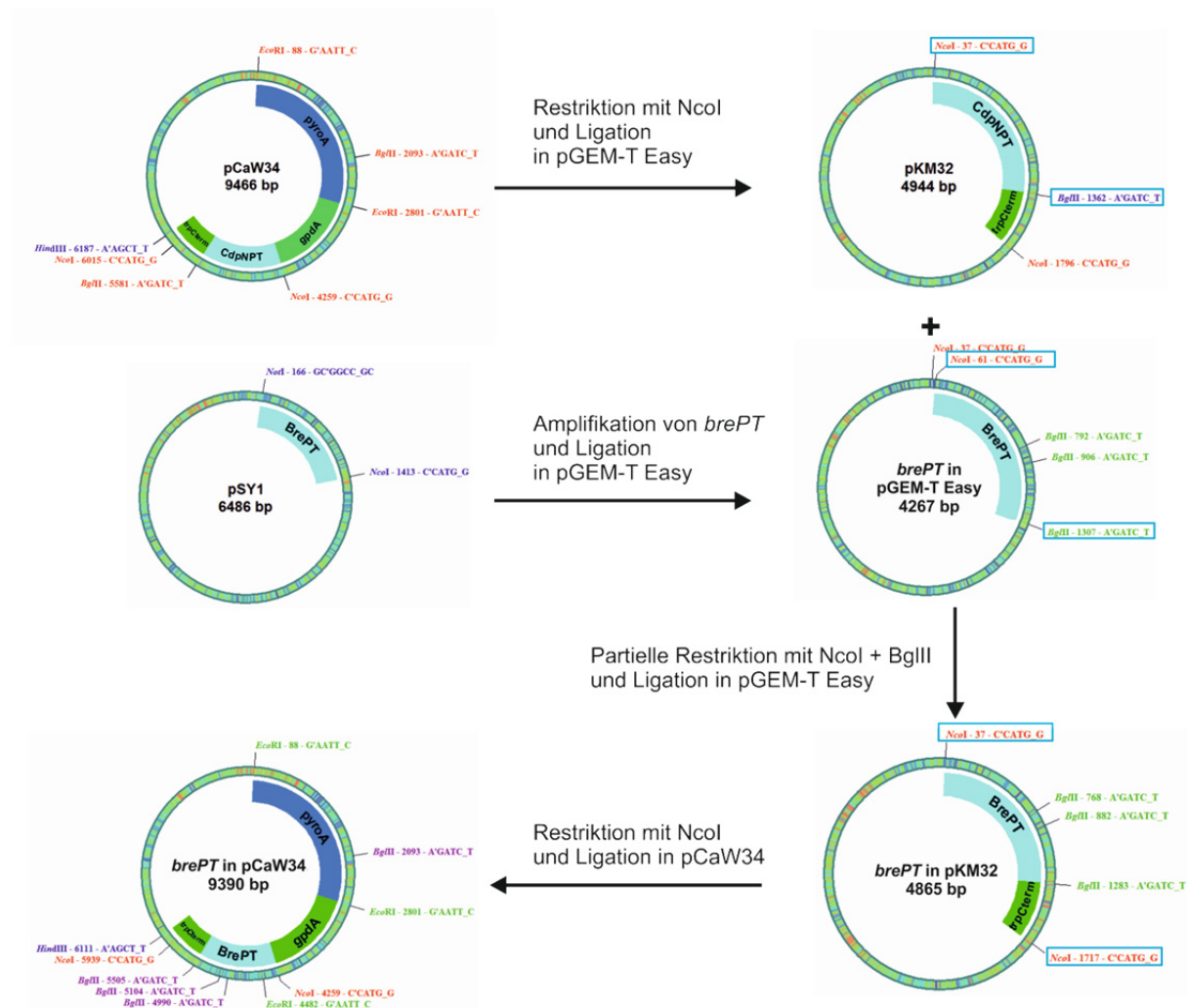


Abbildung 3-49: Geplante Klonierungsstrategie für das Expressionskonstrukt mit *pyroA*, *gpdA*, *brePT* und *trpC_{term}*

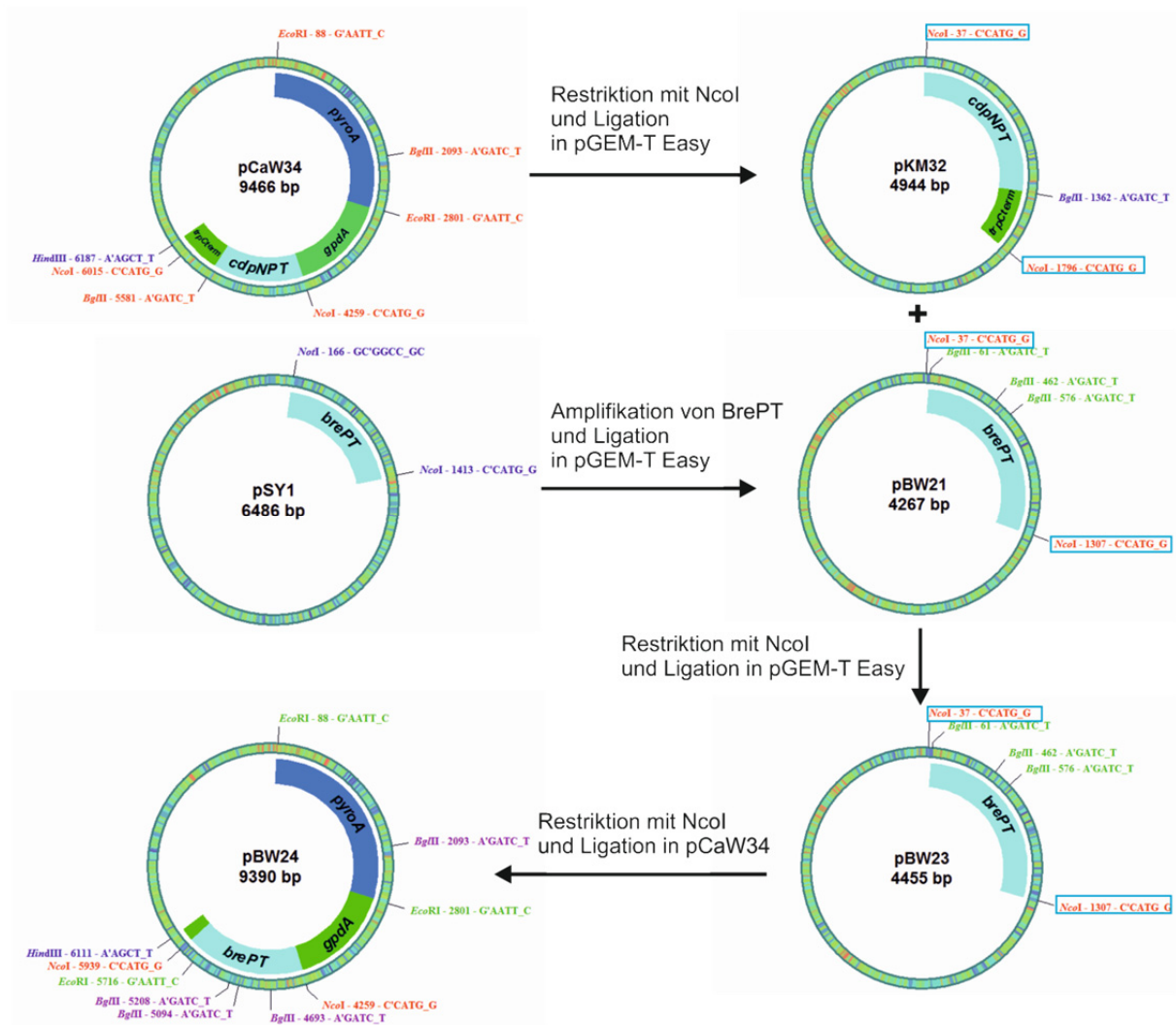


Abbildung 3-50: Tatsächliche Klonierung des Expressionskonstrukt mit *pyroA*, *gpda*, *brePT* und *trpC_{term}*: pBW24

Da nun *brePT* in falscher Orientierung und ohne Terminator in den pKM32 Vektor integriert wurde (pBW23), musste bei der Integration in das pCaW34-Konstrukt mit NcoI darauf geachtet werden, dass *brePT* in richtiger Orientierung, mit dem Promotor vorne und dem Rest des Terminators hinten, integriert wurde. Aufgrund dessen wurden verschiedene Kontrollrestriktionen mit dem erhaltenen pBW24-Konstrukt durchgeführt. Das dazugehörige 0,8%ige Agarosegel ist in folgender Abbildung 3-51 dargestellt.

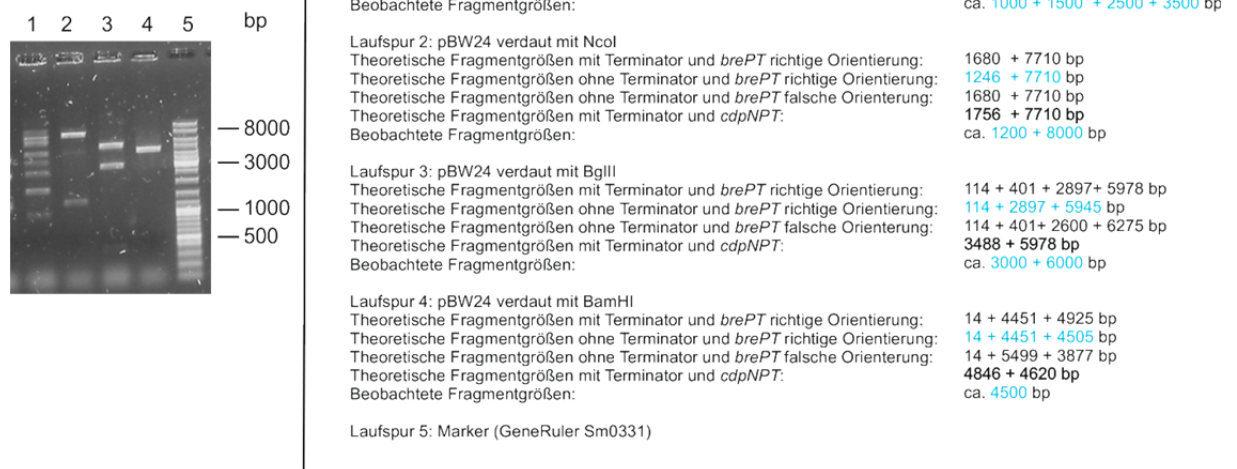


Abbildung 3-51: 0,8%iges Agrosegel verschiedener Kontrollrestriktionen von pBW24

BrePT konnte letztendlich erfolgreich mit dem Prenyltransferasegen *cdpNPT* im pCaW34-Konstrukt ausgetauscht werden. Jedoch fehlt der erste Teil des Terminators. Da nicht klar war, ob der Terminator für die Expression in *A. nidulans* TN02A7 von Bedeutung ist, wurde im Folgenden das erhaltene Konstrukt pBW24 in den von Carsten Wunsch zur Verfügung gestellten *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*) transformiert.

3.5.3. Protoplastierung und Transformation von *brePT* in den *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*) Transformanten

Das erhaltene Konstrukt pBW24 wurde nun mittels Protoplastierung des *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*) Transformanten in diesen transformiert. Aus drei gut bewachsenen *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*) Platten (GMM-Medium mit den Selektionsmarkern für NRPS Transformanten: Riboflavin, Arginin und Pyridoxin) konnten $1,2 \times 10^{10}$ Protoplasten/ml gewonnen werden. In Abbildung 3-52 sind die dünnwandigen und größeren Protoplasten im Vergleich zu den kleineren Sporen mit Keimschlauch dargestellt.

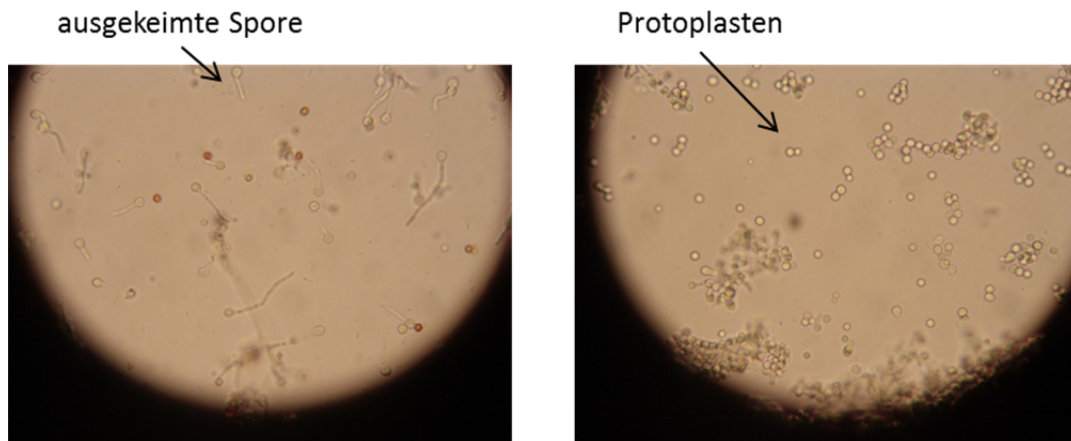


Abbildung 3-52: Lichtmikroskopische Darstellung der erhaltenen Protoplasten mit Sporen

Nach der Transformation von pBW24 (siehe 2.7.16.) wurden die Transformanten auf GMM-Medium mit den Selektionsmarkern für die NRPS+PT Transformanten (Riboflavin und Arginin) ausplattiert. Da pBW24 den Selektionsmarker *pyroA* enthält, brauchte der Pilz in Folge dessen kein Pyridoxin im Medium um zu wachsen. So konnten insgesamt drei Transformanten (*A. nidulans* BW01-BW03 (*ftmPS* + *brePT*)) selektiert und vereinzelt werden (siehe Abbildung 3-53).

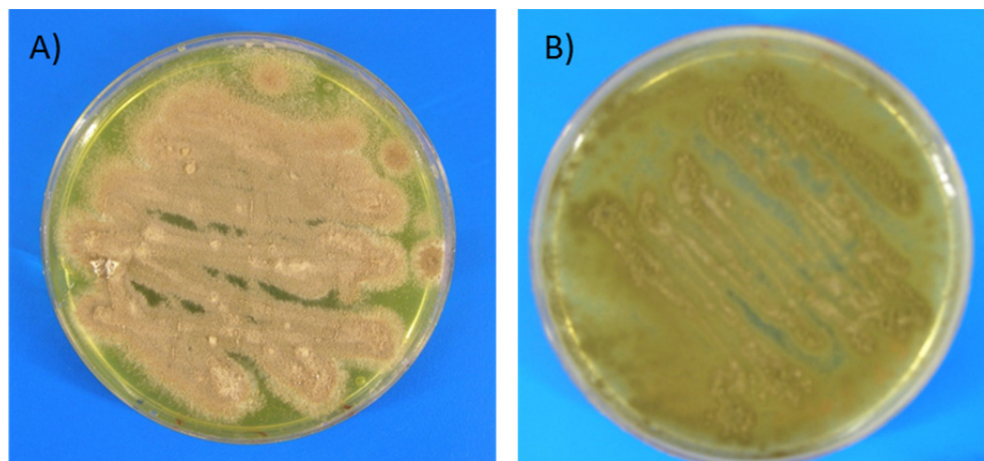
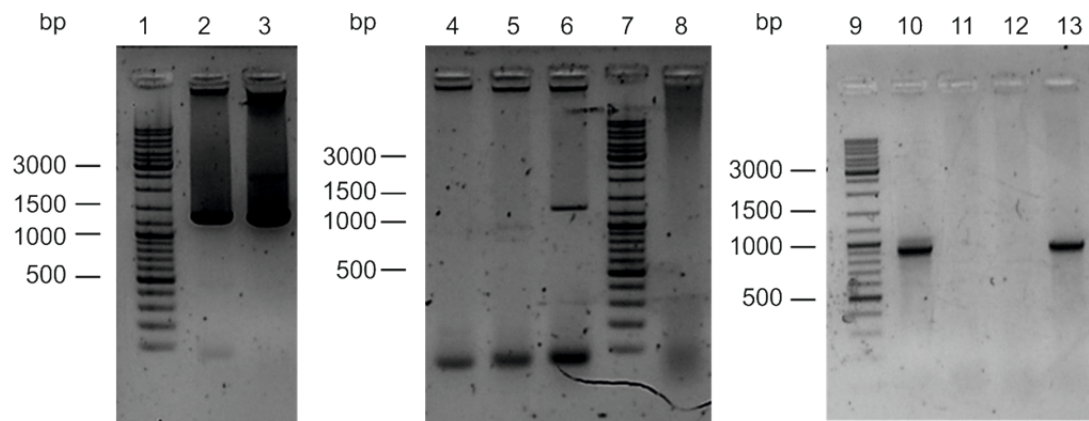


Abbildung 3-53: Agarplatten (GMM-Medium) mit den Transformanten A) *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*) und B) *A. nidulans* BW03 (*ftmPS* + *brePT*)

Von allen drei Transformanten sowie von *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*) wurde von einer fünf Tage alten Submerskultur (HA-Medium) gDNA isoliert. Zur Kontrolle der Transformation wurden verschiedene PCRs durchgeführt. Als *template* dienen die verschiedenen isolierten gDNAs und pSY1 sowie pBW24 (siehe Abbildung 3-54).



- Laufspur 1: Marker (GeneRuler Sm0331)
 Laufspur 2: *template* pSY1 Primer *BrePT_for_3* und *BrePT_rev_3*
 Theoretische Produktlängen: 1246 bp
 Produktlängen im Agarosegel ca. 1200 bp
 Laufspur 3: *template* pBW24 Primer *BrePT_for_3* und *BrePT_rev_3*
 Theoretische Produktlängen: 1246 bp
 Produktlängen im Agarosegel ca. 1200 bp
 Laufspur 4: *template* gDNA von *A. nidulans* BW01 (*ftmPS* + *brePT*) Primer *BrePT_for_3* und *BrePT_rev_3*
 Theoretische Produktlängen: 1246 bp
 Produktlängen im Agarosegel: kein Produkt detektiert
 Laufspur 5: *template* gDNA von *A. nidulans* BW02 (*ftmPS* + *brePT*) Primer *BrePT_for_3* und *BrePT_rev_3*
 Theoretische Produktlängen: 1246 bp
 Produktlängen im Agarosegel: kein Produkt detektiert
 Laufspur 6: *template* gDNA von *A. nidulans* BW03 (*ftmPS* + *brePT*) Primer *BrePT_for_3* und *BrePT_rev_3*
 Theoretische Produktlängen: 1246 bp
 Produktlängen im Agarosegel ca. 1200 bp
 Laufspur 7: Marker (GeneRuler Sm0331)
 Laufspur 8: *template* gDNA von *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*) Primer *BrePT_for_3* und *BrePT_rev_3*
 Theoretische Produktlängen: 1246 bp
 Produktlängen im Agarosegel: kein Produkt detektiert
 Laufspur 9: Marker (GeneRuler Sm0331)
 Laufspur 10: *template* gDNA von *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*) Primer *FtmA_fw* und *FtmA_rv2*
 Theoretische Produktlängen: 906 bp
 Produktlängen im Agarosegel ca. 900 bp
 Laufspur 11: *template* gDNA von *A. nidulans* BW01 (*ftmPS* + *brePT*) Primer *FtmA_fw* und *FtmA_rv2*
 Theoretische Produktlängen: 906 bp
 Produktlängen im Agarosegel: kein Produkt detektiert
 Laufspur 12: *template* gDNA von *A. nidulans* BW02 (*ftmPS* + *brePT*) Primer *FtmA_fw* und *FtmA_rv2*
 Theoretische Produktlängen: 906 bp
 Produktlängen im Agarosegel: kein Produkt detektiert
 Laufspur 13: *template* gDNA von *A. nidulans* BW03 (*ftmPS* + *brePT*) Primer *FtmA_fw* und *FtmA_rv2*
 Theoretische Produktlängen: 906 bp
 Produktlängen im Agarosegel ca. 900 bp

Abbildung 3-54: 1%ige Agarosegele der PCR Produkte von *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*) und *A. nidulans* BW01-BW03 (*ftmPS* + *brePT*)

Mit den Primern *BrePT_for_3* und *BrePT_rev_3* wurde die Insertion von *brePT* überprüft, so konnte wie erwartet ein PCR Produkt mit pSY1 und pBW24 als *template* erhalten werden. Zusätzlich konnte im *A. nidulans* BW03 (*ftmPS* + *brePT*) Transformaten auf der erwarteten Höhe von 1252 bp eine Bande detektiert werden. Gleichzeitig ist diese Bande wie erwartet im PCR Ansatz mit *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*) nicht zu sehen (siehe Abbildung 3-54). Die Insertion von *FtmA* wurde mit den Primern *FtmA_fw* und *FtmA_rv2* überprüft. Hier konnte

ebenfalls aus der gDNA vom *A. nidulans* BW03 (*ftmPS* + *brePT*) Transformanten auf der erwarteten Höhe von ca. 900 bp eine Bande amplifiziert und detektiert werden. Im *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*) Transformanten konnte diese Bande wie erwartet ebenfalls detektiert werden. Somit konnte nach erfolgreicher Protoplastierung und Transformation von pBW24 in *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*) ein positiver Transformant mit der Prenyltransferase BrePT namens *A. nidulans* BW03 (*ftmPS* + *brePT*) erhalten werden.

3.5.4. Kultivierung von *A. nidulans* BW03 (*ftmPS* + *brePT*)

Der erhaltene positive Transformant *A. nidulans* BW03 (*ftmPS* + *brePT*) wurde im Folgenden bei zwei verschiedenen Temperaturen (30 °C und 37 °C) und 120 rpm über fünf Tage als Submerskultur in sieben verschiedenen Medien (CDH-, mCDH-, MEP-, PD-, HA-, GMM- und AMM-Medium) kultiviert. Die Extrakte der 14 Kulturfiltrate wurden wie unter 2.11.4 beschrieben aufgearbeitet und mittels HPLC analysiert. In folgender Abbildung 3-55 sind die HPLC-Chromatogramme dargestellt.

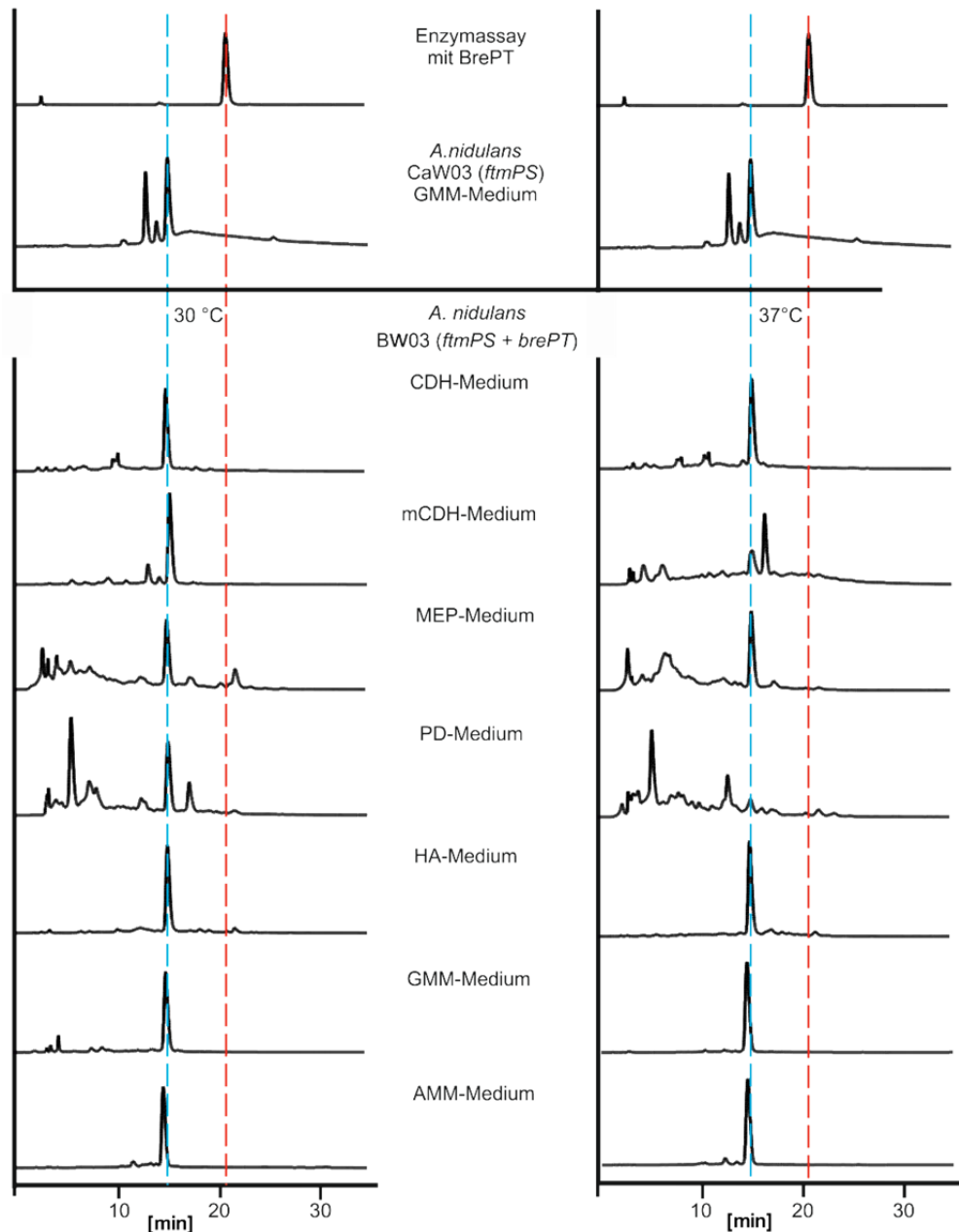


Abbildung 3-55: HPLC-Chromatogramme der Kulturfiltratextrakte von *A. nidulans* BW03 (*ftmPS* + *brePT*) bei 296 nm

Zum Vergleich wurden ebenfalls die HPLC-Chromatogramme von *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*) und einem Enzymassay mit BrePT und Brevianamid F als Substrat dargestellt, wobei die blaue Linie die Retentionszeit von Brevianamid F und die rote Linie die von Deoxybrevianamid E kennzeichnet. BrePT wurde, wie in Yin et al. 2013 beschrieben, aufgereinigt und auch der Enzymassay wurde wie in Yin et al. 2013 beschrieben durchgeführt (Yin et al., 2013). Dabei ist zu erkennen, dass *A. nidulans* BW03 (*ftmPS* + *brePT*) in jedem Medium in unterschiedlichen Konzentrationen von ca. 30 - 80 mg/L Brevianamid F produziert, aber in keinem Extrakt ein Peak bei der Retentionszeit von Deoxybrevianamid E zu erkennen ist.

4. Diskussion

4.1. Zytotoxische Aktivität der Tryprostatin B-Analoga

Im Zuge der Bestimmung der zytotoxischen Aktivität der durch chemoenzymatische Synthese mit FtmPT1 hergestellten Tryprostatin B-Analoga wiesen, bis auf ein paar Ausnahmen wie z.B. **3b** und **14b** in den Assays mit K562, alle prenylierten Substanzen eine ähnliche zytotoxische Aktivität gegenüber einer Zelllinie auf. Dies weist darauf hin, dass die Prolin-Einheit in **1b** für die biologische Aktivität nicht essentiell ist. Interessanterweise zeigten die beiden Zelllinien A2780 sens und A2780 CisR ähnliche zytotoxische Aktivität gegenüber den prenylierten Substanzen auf. Dies bedeutet, dass diese prenylierten Substanzen nicht zwischen dem sensitiven und resistenten Phänotyp von A2780 differenzieren. 2002 und 2008 wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen berichtet, dass **2b** die höchste zytotoxische Wirkung innerhalb der vier Stereoisomere **1b** - **4b** gegenüber menschlicher Lungen- (H520), Brust- (MCF-7) und Prostata- (PC-3) Krebszelllinie aufwies (Jain *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2002). **1b** war toxischer gegenüber H520 und MCF-7 als **3b** und **4b** und alle drei Substanzen **1b**, **3b** und **4b** zeigten ähnliche zytotoxische Aktivität gegenüber der Prostata Zelllinie PC-3 (Jain *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2002). In den von Prof. Kassack durchgeführten Assays wiesen alle vier Stereoisomere von *cyclo*-Trp-Pro (**1b** - **4b**) und *cyclo*-Trp-Ala (**5b** - **8b**) ähnliche IC₅₀-Werte gegenüber den getesteten Zelllinien auf. Dies spricht dafür, dass die Stereochemie an C-11 und C-14 der Diketopiperazine sowie deren Substituenten keinen Einfluss auf die Zytotoxizität nehmen.

4.2. Bildung von Nebenprodukten in Reaktionsansätzen mit FtmPT1

Im Zuge der Isolierung der C2-prenylierten Produkte (**b**-Reihe) der Prenyltransferase FtmPT1 zur Untersuchung der zytotoxischen Aktivität konnten ebenfalls regulär C3- bzw. N1-prenylierte Produkte (**c**- bzw. **d**-Reihe) isoliert werden. Dabei stellte sich heraus, dass L-tryptophanhaltige zyklische Dipeptide mit FtmPT1 zu C3 β -prenylierten Diketopiperazinen umgesetzt wurden und D-tryptophanhaltige zyklische Dipeptide zu C3 α -prenylierten Diketopiperazinen, so dass in beiden Fällen eine *syn-cis* Konfiguration vorlag (Yu *et al.*, 2013) (siehe Abbildungen 3-12 und 3-13). Somit ist es nun ebenfalls durch chemoenzymatische Synthese möglich, neben revers C3- und N1-prenylierten Diketopiperazinen, auch regulär C3-

und N1-prenylierte Diketopiperazine herzustellen. Zum besseren Verständnis, warum es zu diesen zusätzlichen Produkten kommt, wurden daraufhin die K_M -Werte für die verschiedenen Produkte ermittelt. Aus diesen kann man ableiten, dass tryptophanhaltige zyklische Dipeptide mit kleineren Aminosäuren als Prolin z.B. Glycin in **10a** oder Alanin in **5a**, **6a**, **7a** und **8a** schlechtere Substrate für FtmPT1 darstellen. Im Falle von **9a** scheint die elektrostatische Differenz von Prolin und Histidin verantwortlich für die unterschiedliche Affinität zu FtmPT1 zu sein. Aus den Ergebnissen kann man schlussfolgern, dass Substrate mit hoher Affinität zu FtmPT1 hauptsächlich zu Produkten der **b**-Reihe umgesetzt werden. So zeigt FtmPT1 wie erwartet die fast höchste Affinität und Geschwindigkeit gegenüber seinem natürlichen Substrat **1a** mit einem Dominanten **1b** Peak. Die katalytische Effizienz von ungefähr $25312 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ für **1a** ist viel größer als bei den anderen getesteten Substraten. Zwei weitere gut akzeptierte Substrate **3a** und **13a** mit hoher Affinität zu FtmPT1 wurden hauptsächlich zu Produkten der **b**-Reihe mit relativ hoher katalytischer Effizienz von 6407 und $2214 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ umgesetzt. Im Gegensatz dazu wurden die Produkte der **c**-Reihe hauptsächlich in Inkubationsreaktionen mit Substraten niedriger Affinität gebildet, z.B. **10a** und **5a** mit K_M -Werten von 0,77 und 0,54 für **10b** und **5b** bzw. 0,69 und 0,48 für **10c** und **5c**.

4.2.1. Unabhängige Produktbildung der **b**-, **c**-, und **d**-Reihe

Wie bereits erwähnt, wurden im Reaktionsansatz von FtmPT1 reguläre C2-, C3- und N1-prenylierte Produkte identifiziert. Die natürliche Reaktion der Prenyltransferase FtmPT1 ist die reguläre C2-Prenylierung von **1a** zu **1b** in der Biosynthese von Verruculogen bzw. Fumitremorgin A (Li 2011; Mundt *et al.*, 2012). Dass neben dem natürlichen Substrat auch andere zyklische Dipeptide durch FtmPT1 regulär C2-prenyliert wurden, ist nicht weiter erstaunlich, die reguläre C3- bzw. N1-Prenylierung war jedoch unerwartet. Um die Beziehung zwischen den Produkten der **b**-, **c**-, und **d**-Reihe zu untersuchen, wurden Zeitabhängigkeitsassays mit den Substraten **3a**, **6a**, **10a** und **13a** durchgeführt. Wie man in Abbildung 3-14 sehen kann, ist der maximale Umsatz der **b**-Reihe von 60-80% nach ca. 1,5 h erreicht und nach 4 h kam es zu einem Gleichgewicht aller Reihen. Die Bildung der Produkte der **b**-, **c**-, und **d**-Reihe wurden dabei in allen Fällen unabhängig voneinander gebildet. Zusätzlich wurden die Produkte der **b**-, **c**-, und **d**-Reihe von **5a**, **6a**, **8a**, **10a** und **13a** bei 37 °C für 2 h mit DMAPP sowie mit und ohne FtmPT1 inkubiert (siehe Abbildung 3-15). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Produkte der verschiedenen Reihen alle chemisch stabil

sind und nicht weiter von FtmPT1 umgewandelt werden. So wurden keine zusätzlichen Peaks in den HPLC-Chromatogrammen detektiert und die Produkte wurden nicht ineinander umgewandelt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass eine Umwandlung der Reihen während der Bindung am Enzym stattfindet, bevor sie FtmPT1 verlassen.

4.2.2. Hypothetischer Reaktionsmechanismus zur Bildung von C2- und C3 β -prenylierten Produkten durch die Prenyltransferase FtmPT1

Die beobachtete C3-Prenylierung durch die C-2 Prenyltransferase FtmPT1 erscheint anfangs etwas unerwartet. Durch die Substratbindung innerhalb der Bindungstasche von FtmPT1 kann man dieses Phänomen jedoch erklären (Jost *et al.*, 2010). In der Publikation von Jost *et al.* 2010 wurde die Lage von Brevianamid F (**1a**) innerhalb des PT-barrels von FtmPT1 beschrieben. So bildet Brevianamid F eine Wasserstoffbrückenbindung mit seinem Stickstoffatom N-1 zu der Carboxylgruppe von E102 innerhalb von FtmPT1 (siehe Abbildung 4-1). Zusätzlich wird der Indolring von **1a** durch Tyrosin 203 von FmPT1 stabilisiert. Wie bereits mehrfach publiziert wurde (Jost *et al.*, 2010; Luk & Tanner 2009; Metzger *et al.*, 2009) wird das Dimethylallyl-Kation mit seiner delokalisierten positiven Ladung zwischen C-1 und C-3, durch die Eliminierung der Pyrophosphatgruppe mit Hilfe von verschiedenen Aminosäureresten gebildet. Stabilisiert wird das Ganze durch Kationen- π Wechselwirkungen mit dem aromatischen Ringsystem, z.B. durch das Substrat **1a** von einer Seite und dem Tyrosinrest Y382 von der anderen Seite (siehe Abbildung 4-1). Werden diese Kationen nun durch kleinere Substrate als **1a** z.B. **10a**, **5a**, **6a** und **8a** oder aber durch Substrate mit einer anderen elektronischen Dichte, wie im Fall von **9a**, stabilisiert, so können, wie unter 4.1. bereits diskutiert, unterschiedliche kinetische Parameter detektiert werden. In einer weiteren aufgeklärten Struktur von FtmPT1 mit Brevianamid F und einem nicht hydrolysierten Substrat DMSPP (Dimethylallyl-S-Thioldiphosphat) kann man erkennen, dass beide C-Atome, C-2 und C-3, des Indolringes einen Abstand von 3,8 Å zu C-1 von DMSPP haben, somit wäre die Prenylierung beider Positionen durchaus möglich, wobei die C2-Prenylierung von **1a** durch FtmPT1 wahrscheinlicher bleibt (Jost *et al.*, 2010). Ein ähnliches Verhalten wird für die Stereoisomere von **1a** erwartet. Diese Hypothese wird durch deutliche dominante C2-Prenylierungen von **1a**, **2a** und **4a** unterstützt. Andere Diketopiperazine könnten in Bezug auf Geometrie und Elektrostatik etwas ungünstiger im aktiven Zentrum von FtmPT1 liegen, so dass eine C3-Prenylierung bevorzugt würde, was, wie

man unter 3.2.5. sehen kann, tatsächlich der Fall war. Diese Beobachtungen werden durch die bestimmten kinetischen Parameter (siehe auch 4.1.) unterstützt. Wie bereits erwähnt, werden die drei am besten akzeptierten Substrate **1a**, **13a** und **3a**, mit K_M -Werte von 0,16, 0,27 und 0,14 mM sowie katalytischen Effizienzen (k_{cat}/K_M) von 25312, 6407 und 2214 $s^{-1}M^{-1}$, hauptsächlich zu Produkten der **b**-Reihe umgesetzt. Im Gegensatz dazu werden die Produkte des schlecht akzeptierten Substrates **10a**, mit K_M -Werten von 0,77 und 0,69 für die Produkte der **b**- bzw. **c**-Reihe im Verhältnis 3:1 gebildet.

Ein hypothetischer Reaktionsmechanismus könnte folglich mit einem simultanen Angriff des elektronenreichen Indolrings von C-2 und C-3 zu C-1' des Dimethylallyl-Kations beginnen (siehe Abbildung 4-1.). Das Verhältnis der Produktbildung könnte durch die Position des Substrates und durch den Abstand von C-2 zu C-1' bzw. C-3 zu C-1' bestimmt werden. Durch einen Angriff auf C-2 könnte durch Weg A, wie in Abbildung 4-1 dargestellt, das Intermediat **I** und durch einen Angriff auf C-3 durch Weg B könnte das Intermediat **II** entstehen. Zur Bildung eines C2-prenylierten Produktes ist im Folgenden nur noch ein deprotonierender Schritt notwendig. Zur Bildung eines C3-prenylierten Produktes ist die Ringschließung und somit der Angriff des C-2 Protons an das elektronenreiche N-12 wie für reverse C3-Prenylierungen notwendig (Yin *et al.*, 2010a). Hierbei entsteht nun Intermediat **III**, welches im Folgenden ebenfalls nur noch deprotoniert werden muss.

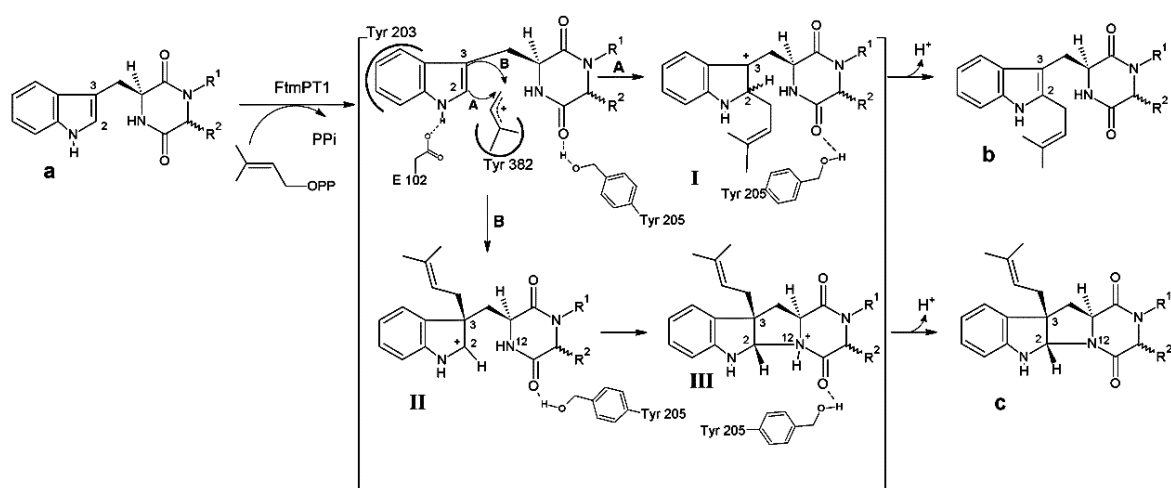


Abbildung 4-1: Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus der C2- und C3 β -prenylierten Produkte der Prenyltransferase FtmPT1 mit L-Tryptophan haltigen zyklischen Dipeptiden

4.2.3. Hypothetischer Reaktionsmechanismus zur Bildung von N1-prenylierten Produkten durch die Prenyltransferase FtmPT1

Neben der erwarteten regulären C2-Prenylierung durch die Prenyltransferase FtmPT1 konnten im Zuge dieser Arbeit auch regulär C3- und regulär N1-prenylierte Produkte aus Reaktionsansätzen mit FtmPT1 und DMAPP isoliert werden. Im oberen Abschnitt wurde bereits ein Reaktionsmechanismus für die regulär C3-prenylierten Produkte unter Bildung eines Hexahydropyrroloindoles postuliert. Die Bildung einer regulären N1-Prenylierung könnte ähnlich, mit einem Angriff des Dimethylallyl-Kations an Position N-1 (Angriff **A** in Abbildung 4-2) und anschließender Deprotonierung des Intermediates **I**, vonstatten gehen, wie es bereits für die reversen N-1 Prenyltransferasen CymD und cTrpPT postuliert wurde (Qian *et al.*, 2012; Zou *et al.*, 2010). Da dieses N-1 jedoch ein schwaches Nucleophil darstellt und die Röntgen-Struktur von FtmPT1 einen Abstand von 5 Å zwischen dem N-1 Atom des Indols und dem C-1 Atom des Dimethylallyl Kations vorhersagt, ist dieser Mechanismus eher unwahrscheinlich. Ein alternativer Reaktionsmechanismus (Angriff **B** in Abbildung 4-2) wäre eine reverse C3-Prenylierung zu Intermediat **II** mit anschließendem Azo-Cope-Rearrangement zu Intermediat **III** und Deprotonierung zur endgültigen regulären N1-Prenylierung, wie es von der Arbeitsgruppe von Prof. Tanner aus Kanada für das regulär N1-prenylierte 2-Methyl-Brevianamid F Produkt durch die Prenyltransferase FtmPT1 postuliert wurde (siehe Abbildung 4-2) (Mahmoodi & Tanner 2013). Dieser Mechanismus ist wahrscheinlicher, da das C-3 Atom eine bessere nucleophile Position als das N-1 Atom darstellt und nur 3,5 Å vom Dimethylallyl-Kation entfernt liegt (Mahmoodi & Tanner 2013). Diese Bildung mittels Azo-Cope-Rearrangement wurde ebenfalls für die reverse N1-Prenylierung verschiedener Indolderivate durch CymD über eine reguläre C3-Prenylierung, sowie für die reguläre C4-Prenylierung verschiedener Indolderivate über eine reverse C3-Prenylierung durch die Prenyltransferase 4-DMATS beschrieben (Luk *et al.*, 2011; Majmudar & Gibbs 2011; Qian *et al.*, 2012).

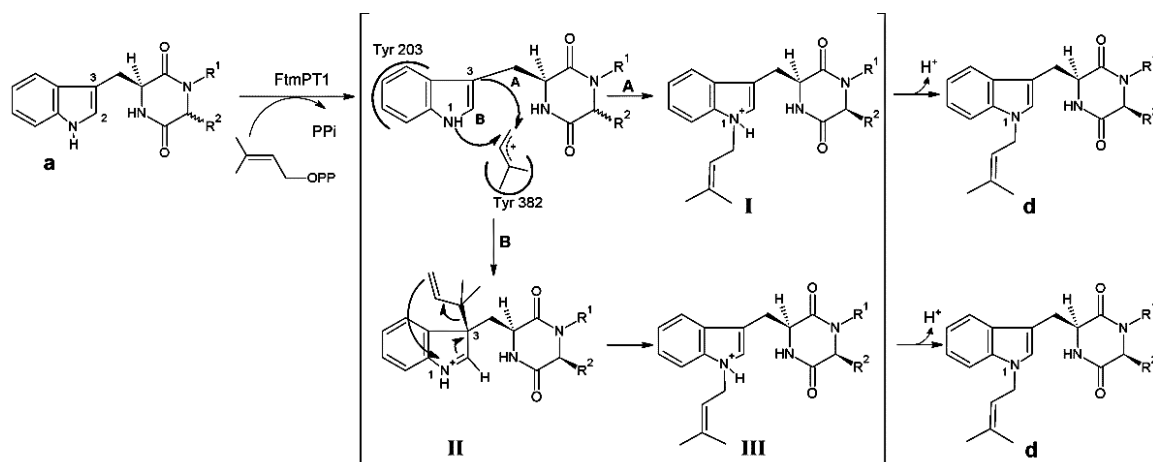


Abbildung 4-2: Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus der N1-prenylierten Produkte der Prenyltransferase FtmPT1

4.3. Isolierung von Fumigaclavin A aus *P. commune* NRRL2033

Durch die erfolgreiche Isolation von Fumigaclavin A aus *P. commune* NRRL2033 konnte die Stereochemie von Fumigaclavin A mittels NOESY-Spektroskopie als (8R,9S)-Fumigaclavin A festgelegt werden (siehe Abbildung 3-17). Wie bereits erwähnt, konnte Dr. Marco Matuschek durch *in vitro* Versuche mit FgaOx3_{PC} und FgaFS_{PC} mit dem Substrat Chanoclavin-I Aldehyd beide möglichen Produkte, Festuclavin und Pyroclavin produzieren. Mit der nun festgestellten Stereochemie von Fumigaclavin A kann man jetzt das tatsächliche *in vivo* Produkt der Biosynthese festlegen. Da es sich um (8R,9S)-Fumigaclavin A handelt, muss es sich in der Vorstufe folglich um Pyroclavin handeln, da hier ebenfalls eine 8R-Konfiguration vorliegt (siehe Abbildung 4-3).

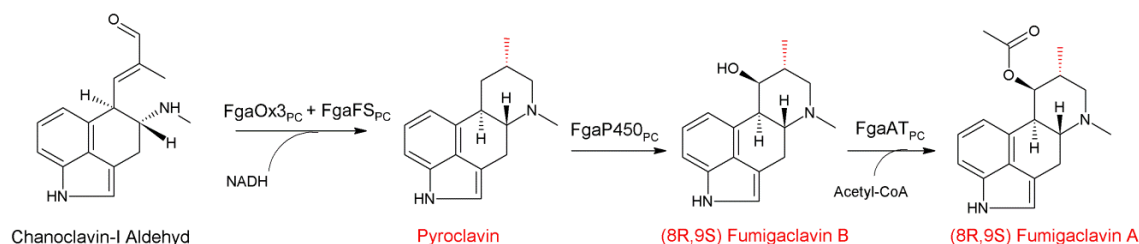


Abbildung 4-3: Fumigaclavin A Biosynthese in *P. commune* NRRL2933. Die rot markierte Stereochemie konnte im Laufe dieser Arbeit bestätigt werden.

4.4. Biosynthese von Alkaloiden des Fumitremorgin-Typs aus *N. fischeri* NRRL181

Durch Screeningversuche mit insgesamt sechs verschiedenen Medien, zwei Temperaturen sowie durch Kultivierungen bei 120 rpm bzw. 0 rpm und Kultivierung des Pilzes als Emers- und Submerskulturen wurden vier verschiedene Kultivierungsbedingungen ausgewählt, unter denen *N. fischeri* NRRL181 im 4000 ml bzw. 500 ml Maßstab kultiviert wurde. Um eine Vortrennung der Extrakte zu erhalten, wurden diese an Kieselgel chromatographiert und die Isolierung erfolgte anschließend mittels semipräparativer HPLC. Insgesamt konnten auf diese Weise zehn verschiedene Sekundärmetabolite aus *N. fischeri* NRRL181 isoliert und charakterisiert werden. So konnten unter anderem die bekannten Sekundärmetabolite aus *N. fischeri* Acetylaszonalenin und Aszonalenin isoliert werden (Yin *et al.*, 2009b). Auf die Biosynthese der anderen acht isolierten Naturstoffe wird im Folgenden genauer eingegangen.

4.4.1. Biosynthese von Fumitremorgin A

Durch die erfolgreiche Isolierung von Fumitremorgin A konnte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Kathrin Mundt der letzte Schritt der Biosynthese von Fumitremorgin A, die O-Prenylierung von Verruculogen durch FtmPT3, aufgeklärt werden (Mundt *et al.*, 2012). Diese Akkumulation von Fumitremorgin A in *N. fischeri* wurde bereits 1989 von Nielsen *et al.* dokumentiert (Nielsen *et al.*, 1989). Durch die Produktion in diesem konkreten Stamm jedoch konnte nachgewiesen werden, dass die verantwortlichen Gene auch tatsächlich exprimiert und somit die entsprechende cDNA zur Amplifikation gebildet wird. Neben dem Endprodukt der Biosynthese konnten auch die Vorstufen Verruculogen, Fumitremorgin B und 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C mittels semipräparativer HPLC isoliert werden (siehe Abbildung 4-4).

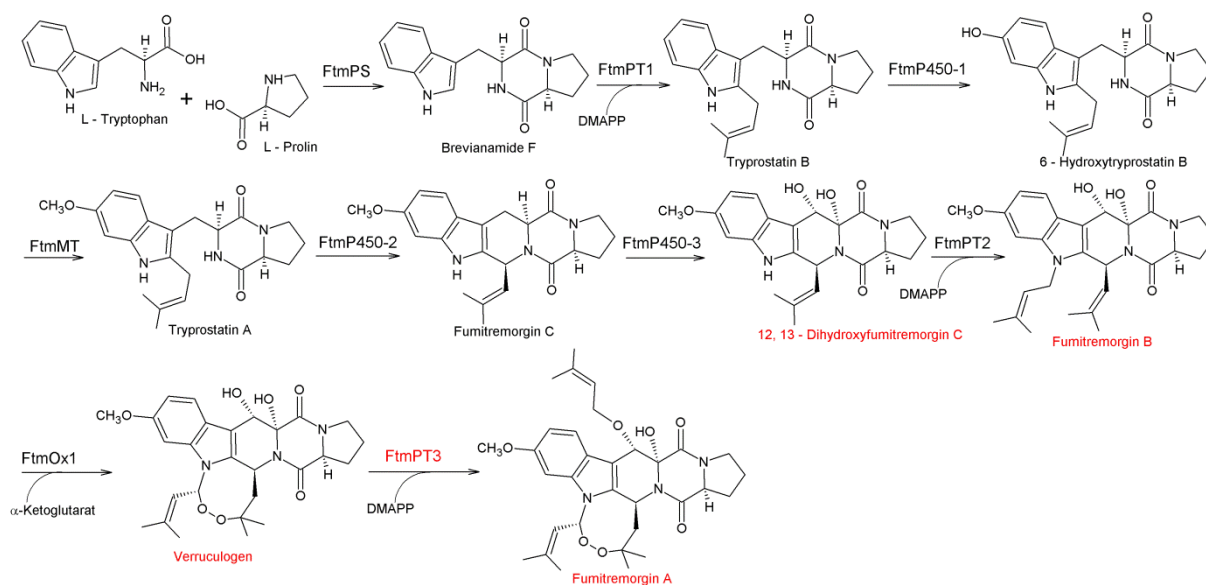


Abbildung 4-4: Biosynthese von Fumitremorgin A in *N. fischeri*. Die rot markierten Substanzen wurden im Laufe dieser Arbeit aus *N. fischeri* NRRL181 isoliert.

4.4.2. Biosynthese von Verruculogen TR-2

Zusätzlich zu Fumitremorgin A konnten weitere Alkaloide des Fumitremorgin-Typs aus *N. fischeri* NRRL181 isoliert und deren Struktur mittels NMR- und ESI-MS-Spektroskopie aufgeklärt werden. Als erstes ist hierbei Verruculogen TR-2 zu nennen. Diese Verbindung wurde 2007 von der Arbeitsgruppe von Prof. Frisvad aus *N. fischeri* und *A. fumigatus* isoliert (Larsen *et al.*, 2007). Bereits in den 80er Jahren wurden von Willingale *et al.* Überlegungen zur Biosynthese von Verruculogen TR-2 unternommen. Sie vermuteten, basierend auf radioaktiv-Versuchen, das Verruculogen TR-2 eine Vorstufe in der Biosynthese von Verruculogen darstellt (Willingale *et al.*, 1983). Zwei andere Publikationen hingegen behaupten das genaue Gegenteil, dass Verruculogen TR-2 ein weniger toxisches Abbauprodukt des tremorgenen Myxotoxins Verruculogen darstellt (Fill *et al.*, 2012; Perera *et al.*, 1982). Eine andere mögliche Produktion von Verruculogen TR-2 ist die Hydroxylierung von Fumitremorgin C durch eine Hydroxylase. Diese Reaktion könnte jedoch auch spontan bzw. ohne Einfluss eines Enzyms vonstatten gehen. Neben diesem verantwortlichen Gen könnte eine Methyltransferase liegen, da neben Verruculogen TR-2 auch 12 β -Hydroxy-13 α -Methoxyverruculogen TR-2 aus *A. fumigatus* isoliert werden konnte (siehe Abbildung 4-5) (Li *et al.*, 2012).

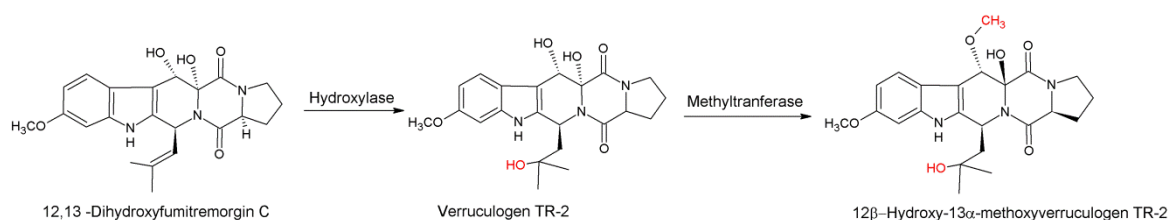


Abbildung 4-5: Hypothetische Biosynthese von Verruculogen TR-2 und 12β-Hydroxy-13α-Methoxyverruculogen TR-2

Es wurde vermutet, dass eines der beiden Gene, *NFIA_093380* und *NFIA_093390*, oder aber auch beide, welche für ein hypothetisches Protein bzw. einem *Ankyrin-repeat* Protein codieren, für diesen Biosyntheseschritt verantwortlich sein könnten. Der Grund für diese Vermutung ist in der Lage der Enzyme zu FtmPT3 zu finden. Da die meisten Gene einer Biosynthese innerhalb eines Clusters liegen, wurde vermutet, dass *ftmPT3* in einem neuen noch unentdeckten Cluster liegt. Nach Klonierung und Überproduktion der beiden Gene in *E. coli*-Stämmen wurden diese in verschiedenen Enzymassays getestet, jedoch konnte keine Umsetzung zu Verruculogen TR-2 detektiert werden. Ein Grund dafür könnte sein, dass die beiden aus *E. coli* aufgereinigten Proteine inaktiv sind. Eine mögliche Ursache für die Inaktivität könnte z.B. eine falsche Faltung des eukaryotischen Proteins durch die prokaryotischen *E. coli*-Zellen sein. Um dies auszuschließen, müssten die beiden Proteine z.B. in *S. cerevisiae*-Zellen aufgereinigt und die Aktivität erneut getestet werden. Es könnten aber auch andere Gene für diesen Biosyntheseschritt verantwortlich sein. Da in den Zufütterungsversuchen mit Tryprostatin B gezeigt wurde, dass Verruculogen TR-2 biosynthetisch tatsächlich aus Tryprostatin B entsteht, könnte man das Genom von *N. fischeri* NRRL181 nach weiteren potenziellen Genen für diese Reaktion untersuchen.

4.4.3. Biosynthese der Spirotryprostatine

Neben dem Mykotoxin Verruculogen TR-2 konnten auch zwei Spirotryprostatine: Spirotryprostatin A und 6-Methoxyspirotryprostatin B aus dem Mycel von *N. fischeri* NRRL181 isoliert und die Strukturen mittels NMR- und ESI-MS-Spektroskopie aufgeklärt werden. Spirotryprostatin A wurde erstmals 1996 aus *A. fumigatus* isoliert und ist, wie schon Brevianamid F, ein Zellzyklus Inhibitor von tsFT210 Mäusezellen in der G2/M Phase mit IC₅₀-Werten von 197,5 µM. 6-Methoxyspirotryprostatin B hingegen wurde 2008 das erste Mal aus *Aspergillus sydowi* isoliert (Zhang *et al.*, 2008). Diese Substanz weist gegenüber der Lungenkrebszelllinie A-549 und der Leukämiekrebszelllinie HL-60 IC₅₀ Werte von 8,29 µM

bzw. 9,71 μM auf (Zhang *et al.*, 2008). Beide Spirotryprostatine wurden im Laufe dieser Arbeit das erste Mal aus *N. fischeri* isoliert. Neben diesen beiden Spirotryprostatinen konnte ebenfalls ein neuer Naturstoff, welcher hier Substanz 15 genannt wird, aus dem Kulturfiltrat von *N. fischeri* NRRL181 isoliert werden. Das ^1H -NMR-Spektrum wies deutliche Ähnlichkeit zu Compound 1 auf, welcher 2008 das erste Mal von Wang *et al.* aus *A. fumigatus* isoliert wurde (Wang *et al.*, 2008). Von zwei weiteren Arbeitsgruppen wurde diese Substanz 2012 ebenfalls aus *A. fumigatus* isoliert (Afiyatulloev *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012). Im ^1H -NMR-Spektrum sieht man, dass die Signale der neuen Substanz im aromatischen Bereich und in der Prenyl-Einheit etwas ins Tieffeld verschoben sind und H-8 ins Hochfeld. Durch weitere NMR-Analysen (^{13}C -NMR, HSQC, HMBC und NOESY) konnte schließlich die Struktur von Substanz 15 aufgeklärt werden. So ist bei Substanz 15 im Vergleich zu Compound 1 die Stereochemie an C-8 und C-18 unterschiedlich. Als nächstes stellte sich die Frage, wie diese Spirotryprostatine im Pilz gebildet werden. Deshalb wurde neben *NFIA_093380* und *NFIA_093390* auch das potenzielle Membranprotein *NFIA_093340* mit einer Dömane der Hydroxylase-Superfamilie aus gDNA von *N. fischeri* amplifiziert und erfolgreich in *S. cerevisiae*-Zellen über-exprimiert bzw. -produziert. Mit der erhaltenen Membranfraktion wurden verschiedene Enzymassays durchgeführt, jedoch konnte in keinem der Assays mittels analytischer HPLC ein Produktpeak detektiert werden. Da keines der in dieser Arbeit klonierten und überproduzierten Enzyme, auch FtmO und FtmP, Aktivität aufwies, wurde im Folgenden spekuliert, dass die verantwortlichen Gene für die Spirotryprostatin Biosynthese in einem anderen Cluster liegen müssen. Durch Blast-Analysen wurde ein weiteres potenzielles Cluster in *A. fumigatus* entdeckt. Hierbei handelt es sich um ein homologes Cluster von *P. aethiopicum*, dem Tqa-Cluster zur Bildung von Tryptoquialanin. Wobei *NFIA_057970* bzw. *AFUA_6G12060* mit maximaler Identität von 44% bzw. 54% zu der MAK1-like Monooxygenase TqaH für die Bildung der Spirotryprostatine verantwortlich sein könnte. Diese Vermutung wurde aufgrund der Reaktion von Fumiquinazolin F zu Fumiquinazolin A bzw. 2-epi-Fumiquinazolin A über ein Epoxyindole bzw. ein Hydroxyiminium angestellt (Walsh *et al.*, 2013) (siehe Abbildung 4-6).

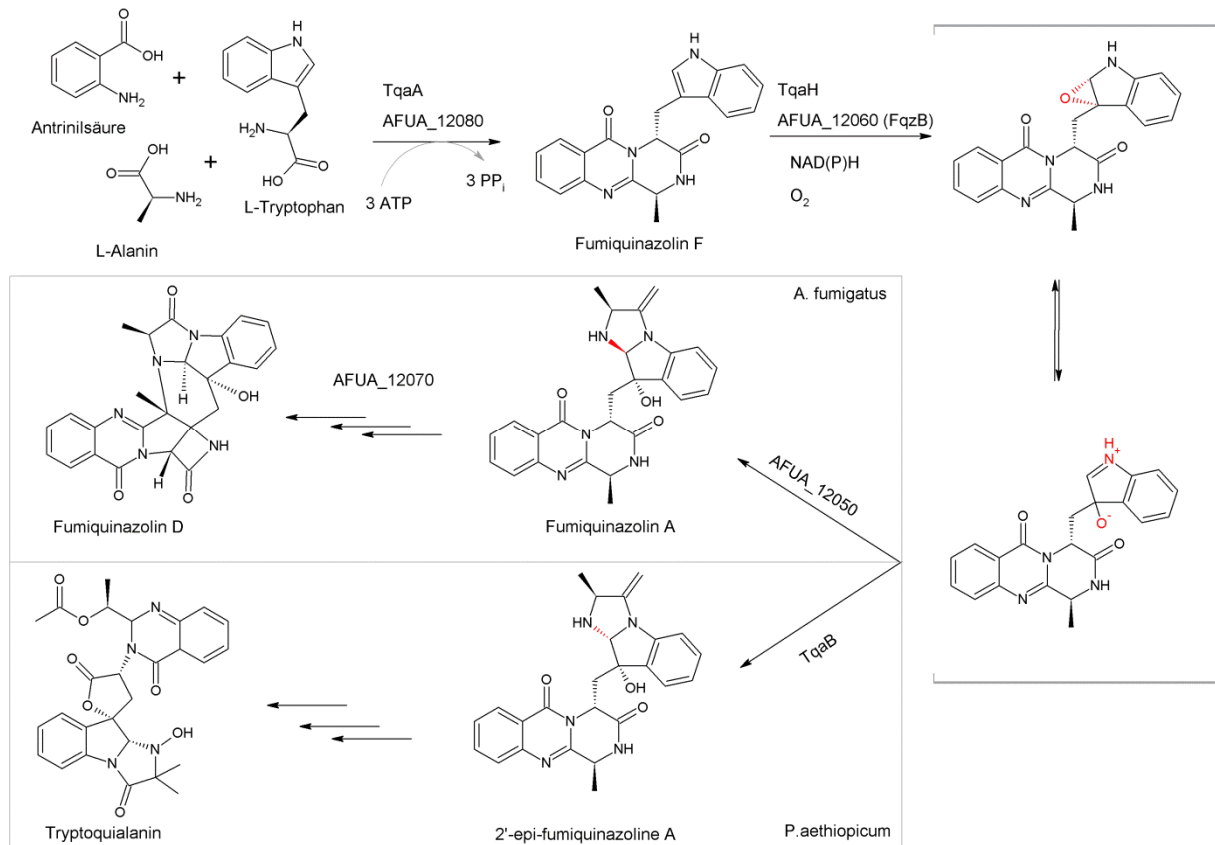


Abbildung 4-6: Biosynthese von Fumiquinazoline D in *A. fumigatus* bzw. Tryptoqualin in *P. aethiopicum*

Für diese Biosynthese von Fumiquinazolin D benötigt *A. fumigatus* folglich vier Enzyme, *AFUA_6G12050*, *AFUA_6G12060*, *AFUA_6G12070* und *AFUA_6G12080*. Durch Blast Analysen wurde festgestellt, dass drei dieser Gene ebenfalls in *N. fischeri* NRRL181 zu finden sind (siehe Abbildung 4-7).

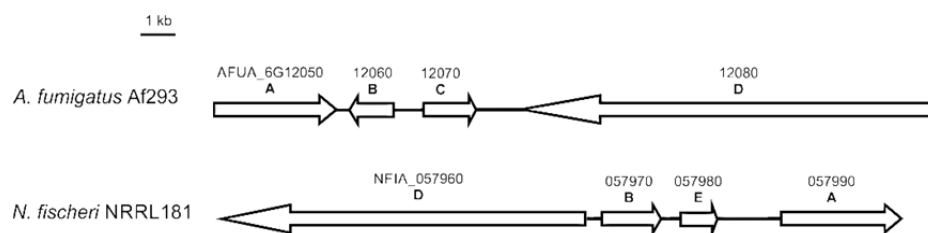


Abbildung 4-7: Hypothetisches Spirotryprostatin Gencluster in *A. fumigatus* und *N. fischeri* A) NRPS B) MAK1-like Monooxygenase C) FAD binding domain Protein D) NRPS E) 2OG-Fe(II) Oxygenase Familie Oxidoreduktase

Aufgrund dessen wurde vermutet, dass *NFIA_057970*, das homologe Gen zu *tqaH*, für die Bildung von Spirotryprostatin A zuständig ist und die Oxidoreduktase *NFIA_057980* für die Bildung von 6-Methoxyspirotryprostatin B. Der neue Naturstoff Substanz 15 hingegen könnte ebenfalls durch *NFIA_057970* entstehen, jedoch würde in diesem Fall der Spiro-Ring durch

die Umlappung von C-3 auf C-2 entstehen und nicht wie bei den anderen Spirotryprostatinen, von C-2 auf C-3. Da neben diesen drei Spirotryprostatinen aus *N. fischeri* keine weiteren Spirotryprostatine isoliert werden konnten, wird in Abbildung 4-8 nun ein Biosyntheseweg postuliert.

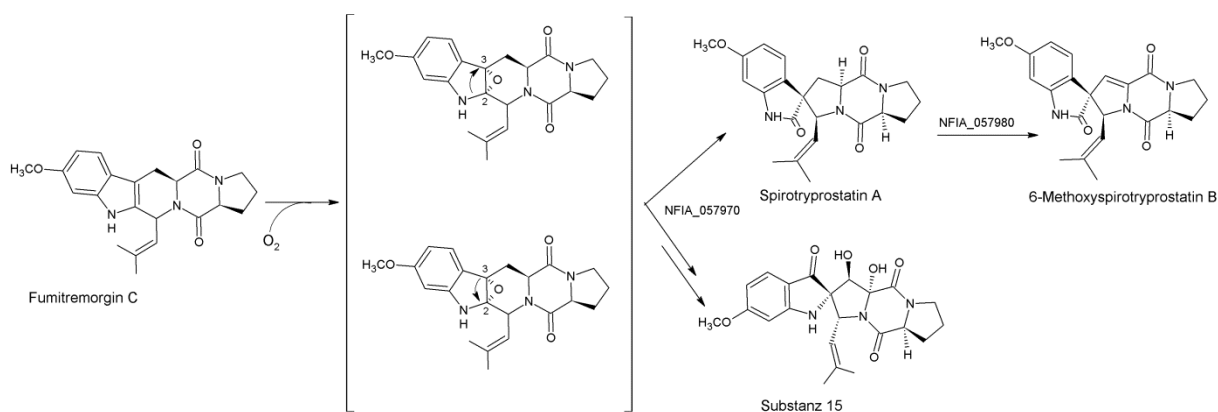


Abbildung 4-8: Hypothetischer Biosyntheseweg der Spirotryprostatine in *N. fischeri* NRRL181

Da jedoch, wie man dem Zufütterungsversuch von Tryprostatin B entnehmen kann, Substanz 15 anscheinend nicht aus Tryprostatin B und somit nicht aus Fumitremorgin C bzw. 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C synthetisiert wird, müsste die Biosynthese von Substanz 15 ganz neu überdacht werden. Die postulierte Biosynthese von Spirotryprostatin A hingegen wurde durch die Arbeitsgruppe von Prof. Watanabe aus Japan bestätigt. Er konnte durch heterologe Genexpression von FqzB (*AFUA_6g12060*) aus *A. fumigatus* Af293 in *E. coli* BL21 und Enzymassays mit FqzB bestätigen, dass dieses Gen tatsächlich für die Bildung von Spirotryprostatin A über ein Epoxyindol mittels Epoxidation verantwortlich ist (Tsunematsu *et al.*, 2013). Durch Biotransformation konnte zusätzlich gezeigt werden, dass 6-Methoxyspirotryprostatin B durch FtmG (FtmP450-3) ebenfalls aus Fumitremorgin C und nicht, wie vorher vermutet, aus Spirotryprostatin A gebildet wird (siehe Abbildung 4-9) (Tsunematsu *et al.*, 2013).

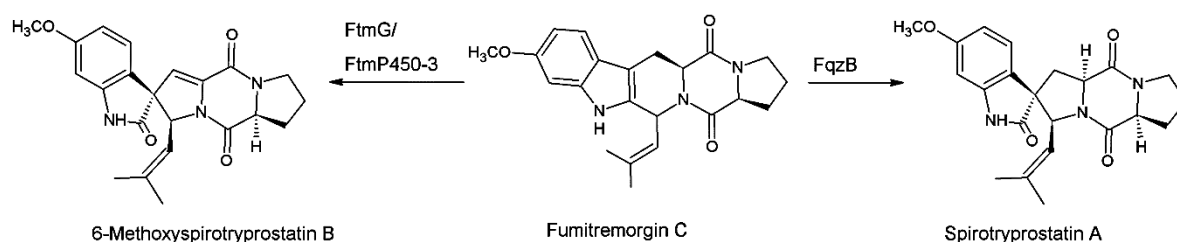


Abbildung 4-9: Biosynthese von 6-Methoxyspirotryprostatin B und Spirotryprostatin A in *A. fumigatus* (Tsunematsu *et al.*, 2013)

Diese Ergebnisse bestätigen folglich die Annahme, dass Spirotryprostatin A in *N. fischeri* NRRL181 tatsächlich durch *NFIA_057970* dem homologen Protein von FqzB gebildet wird. Um sicher zu gehen, müsste dieses Gen ebenfalls durch heterologe Genexpression in *E. coli* überproduziert und die Aktivität in Enzymassays bestätigt werden, das Gleiche gilt für *ftmP450-3* aus *N. fischeri* NRRL181. Dem homologen Gen aus *A. fumigatus* Af293: *ftmG* wurde bereits von Kato *et al.* im Jahr 2009 die Hydroxylierung von Fumitremorgin C zu 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C zugeordnet (siehe Abbildung 1-14) (Kato *et al.*, 2009). Durch Biotransformationsversuche von Tsunematsu *et al.* soll FtmP450-3 auch für die Biosynthese von Spirotryprostatin B aus Demethoxyfumitremorgin C verantwortlich sein (Tsunematsu *et al.*, 2013). Diese Reaktionen könnte man, wie bereits erwähnt, mit Hilfe von rekombinant hergestelltem FtmP450-3 bzw. EAW16447 (*NFIA_057970*) überprüfen. Aufgrund fehlender Zeit konnten diese Experimente jedoch nicht mehr im Zuge dieser Arbeit durchgeführt werden.

4.5. *In vivo* Produktion von Deoxybrevianamid E in *A. nidulans* TN02A7

Durch Transformation des Prenyltransferasegens *brePT* in *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*) sollte die Produktion von Deoxybrevianamid E in den erhaltenen Transformanten detektiert werden. Zunächst wurde hierfür *brePT* in das von Carsten Wunsch bereitgestellte pCaW34-Konstrukt, basierend auf pQE60 mit dem konstitutiven *gpdA* Promotor, dem Selektionsmarker *pyroA* und dem Terminator *trpC_{term}*, umklont. Im Zuge dieser Umklonierung wurde jedoch die Anfangssequenz des *trpC_{term}* Terminators weggeschnitten, so dass diese im enthaltenen pBW24-Konstrukt fehlt. Nach erfolgreicher Transformation von pBW24 in *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*) konnte durch PCR-Screening ein positiver Transformant *A. nidulans* BW03 (*ftmPS* + *brePT*) erhalten werden. Dieser wurde unter

verschiedenen Bedingungen kultiviert, es konnte aber unter keiner der getesteten Bedingung eine Deoxybrevianamid E-Produktion mittels analytischer HPLC detektiert werden. Ein Grund hierfür könnte die fehlende 434 bp große *TrpC_{term}* Terminator Sequenz sein. Durch den fehlenden Transkriptionsterminator und somit die fehlende Haarnadelstruktur mit einhergehender Stabilisierung der mRNA, könnte diese durch 3'-Exonukleasen abgebaut werden. Durch den daraus resultierend fehlenden Poly-A-Schwanz wiederum könnte die darauffolgende Translation beeinflusst werden (Madigan & Martinko 2006). Die *in vivo* Coexpression von mehreren verschiedenen Biosynthesegenen ist jedoch eine vielversprechende Methode, um neue Naturstoffe und damit neue Medikamente zu modellieren. Die unter anderem in dieser Arbeit gezeigte breite Substratspezifität verschiedener Prenyltransferasen sowie die hier ebenfalls präsentierte, mit der Prenylierung einhergehende biologische Aktivität, spielen dabei eine bedeutende Rolle (Wollinsky *et al.*, 2012a; Wollinsky *et al.*, 2012b).

5. Referenzen

Afiyatullof, S. S., Zhuravleva, O. I., Antonov, A. S., Kalinovskiy, A. I., Pivkin, M. V., Menchinskaya, E. S. & Aminin, D. L. (2012). New Metabolites from the Marine-derived Fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nat. Prod. Com.* **7**, 497-500.

Alexopoulos, C. J., Mims, C. W. & Blackwell, M. (1996) *Introductory Mycology*. New York: John Wiley & Sons.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. (1996) *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons Inc.

Ballance, D. J., Buxton, F. P. & Turner, G. (1983). Transformation of *Aspergillus nidulans* by the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **112**, 284-289.

Bauer, J., Gareis, M., Bott, A. & Gedek, B. (1989). Isolation of a mycotoxin (gliotoxin) from a bovine udder infected with *Aspergillus fumigatus*. *J Med Vet Mycol* **27**, 45-50.

Berse, B., Dmochowska, A., Skrzypek, M., Weglenski, P. B. M. A. & Weiss, R. L. (1983). Cloning and characterization of the ornithine carbamoyltransferase gene from *Aspergillus nidulans*. *Gene* **25**, 109-117.

Beuchat, L.R. (1986). Extraordinary Heat Resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* Ascospores in Fruit Products. *J. Food S.* **51**, 1506-1510.

Bladt, T. T., Frisvad J.C., Knudsen, P. B. & Larsen, T. O. (2013). Anticancer and Antifungal Compounds from *Aspergillus*, *Penicillium* and other Filamentous Fungi. *Molecules* **18**, 11338-11376.

Bonitz, T., Alva, V., Saleh, O., Lupas, A. N. & Heide, L. (2011). Evolutionary relationships of microbial aromatic prenyltransferases. *PLoS One* **6**, e27336.

Bonitz, T., Zubeil, F., Grond, S. & Heide, L. (2013). Unusual N-prenylation in diazepinomicin biosynthesis: The farnesylation of a benzodiazepine substrate is catalyzed by a new member of the ABBA prenyltransferase superfamily. *PLoS. One.* **8**, e85707.

Brakhage, A. A. (2005). Systemic fungal infections caused by *Aspergillus* species: epidemiology, infection process and virulence determinants. *Curr. Drug Targets.* **6**, 875-886.

Bräuer, L., Brandt, W., Schulze, D., Zakharova, S. & Wessjohann, L. (2008). A structural model of the membrane-bound aromatic prenyltransferase UbiA from *E. coli*. *ChemBiochem* **9**, 982-992.

Caballero, E., Avendaño, C. & Menéndez, J. C. (2003). Brief total synthesis of the cell cycle inhibitor tryprostatin B and related preparation of its alanine analogue. *J. Org. Chem* **68**, 6944-6951.

- Caballero, E., Avendaño, C. & Menéndez, J. C. (1998).** Stereochemical issues related to the synthesis and reactivity of pyrazino[2',1'-5,1]pyrrolo[2,3-b]indole-1,4-diones. *Tetrahedron: Asymmetry* **9**, 967-981.
- Cacciatore, I., Cocco, A., Costa, M., Fontana, M., Lucente, G., Pecci, L. & Pinnen, F. (2005).** Biochemical properties of new synthetic carnosine analogues containing the residue of 2,3-diaminopropionic acid: the effect of N-acetylation. *Amino Acids* **28**, 77-83.
- Cerqueira, G. C., Arnaud, M. B., Inglis, D. O., Skrzypek, M. S. et al. (2014).** The *Aspergillus* Genome Database: multispecies curation and incorporation of RNA-Seq data to improve structural gene annotations. *Nuc. Ac. Res.* **42**, D705-D-710.
- Chooi, Y. H., Wang, P., Fang, J., Li, Y., Wu, K., Wang, P. & Tang, Y. (2012).** Discovery and characterization of a group of fungal polycyclic polyketide prenyltransferases. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 9428-9437.
- Ciegler A., Vesendor R.F. & Cole R.J. (1976).** Tremorgenic Mycotoxins. In *Mycotoxins and Other Fungal Related Food Problems*, pp. 163-177. Edited by J. V. Rodricks.
- Coriglione, G., Stella, G., Gafa, L., Spata, G., Oliveri, S., Padhye, A. A. & Ajello, L. (1990).** *Neosartorya fischeri* var. *fischeri* (Wehmer) Mallach and Cain 1972 (Anamorph: *Aspergillus fischerianus* Samson and Gams 1985) as a cause of mycotic keratitis. *Eur. J. Epidemiol.* **6**, 382-385.
- Coyle, C. M., Cheng, J. Z., O'Connor, S. E. & Panaccione, D. G. (2010).** An old yellow enzyme gene that controls the branch point between *Aspergillus fumigatus* and *Claviceps purpurea* ergot alkaloid pathways. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 3898-3903.
- Cui, C. B., Kakeya, H., Okada, G., Onose, R. & Osada, H. (1996a).** Novel mammalian cell cycle inhibitors, tryprostatins A, B and other diketopiperazines produced by *Aspergillus fumigatus*. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *J. Antibiot.* **49**, 527-533.
- Cui, C. B., Kakeya, H., Okada, G., Onose, R., Ubukata, M., Takahashi, I., Isono, K. & Osada, H. (1995).** Tryprostatins A and B, novel mammalian cell cycle inhibitors produced by *Aspergillus fumigatus*. *J. Antibiot.* **48**, 1382-1384.
- Cui, C. B., Kakeya, H. & Osada, H. (1996b).** Novel mammalian cell cycle inhibitors, spirotryprostatins A and B, produced by *Aspergillus fumigatus*, which inhibit mammalian cell cycle at G2/M phase. *Tetrahedron* **52**, 12651-12666.
- Cui, C. B., Kakeya, H. & Osada, H. (1996c).** Novel mammalian cell cycle inhibitors, tryprostatins A, B and other diketopiperazines produced by *Aspergillus fumigatus*. II. Physico-chemical properties and structures. *J. Antibiot.* **49**, 534-540.
- Ding, Y., Wet, J. R., Cavalcoli, J., Li, S. et al. (2010).** Genome-based characterization of two prenylation steps in the assembly of the stephacidin and notoamide anticancer agents in a marine-derived *Aspergillus* sp. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 12733-12740.

- Ding, Y., Williams, R. M. & Sherman, D. H. (2008). Molecular analysis of a 4-dimethylallyltryptophan synthase from *Malbranchea aurantiaca*. *J. Biol. Chem.* **283**, 16068-16076.
- Domsch, K. H., Gams, W. & Anderson, T. H. (1980) *Compendium of Soil Fungi*. UK: Academic Press.
- Edwards, D. J. & Gerwick, W. H. (2004). Lyngbyatoxin biosynthesis: sequence of biosynthetic gene cluster and identification of a novel aromatic prenyltransferase. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 11432-11433.
- Fedorova, N. D., Khaldi, N., Joardar, V. S., Maiti, R. et al. (2008). Genomic islands in the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *PLoS. Genet.* **4**, e1000046.
- Fill, T. P., Asenha, H. B., Marques, A. S., Ferreira, A. G. & Rodrigues-Fo, E. (2012). Time course production of indole alkaloids by an endophytic strain of *Penicillium brasilianum* cultivated in rice. *Nat. Prod. Res.* 967-974.
- Finefield, J. M., Greshock, T. J., Sherman, D. H., Tsukamoto, S. & Williams, R. M. (2011). Notoamide E: Biosynthetic incorporation into notoamides C and D in cultures of *Aspergillus versicolor* NRRL 35600. *Tetrahedron Lett.* **52**, 1987-1989.
- Fresenius, G. (1863) *Beiträge zur Mykologie*. Frankfurt: Heinrich Ludwig Brömmmer Verlag.
- Frisvad, J. & Samson, R. A. (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Stud. Mycol.* **49**, 1-174.
- Frisvad, J. C., Smedsgaard, J., Larsen, T. O. & Samson, R. A. (2004). Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Stud. Mycol.* **49**, 201-241.
- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Cuomo, C., Ma, L. J. et al. (2005). Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* **438**, 1105-1115.
- Gams, W., Christensen, M., Onions, A. H. S., Pitt, J. I. & Samson, R. A. (1985). Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*, pp. 55-61. New York: Plenum Press.
- Gao, X., Haynes, S. W., Ames, B. D., Wang, P., Vien, L. P., Walsh, C. T. & Tang, Y. (2012). Cyclization of fungal nonribosomal peptides by a terminal condensation-like domain. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 823-830.
- Geiser, D. M., Klich, M. A., Frisvad, J. C., Peterson, S. W., Varga, J. & Samson, R. A. (2007). The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Stud. Mycol.* **59**, 1-10.
- Girardin, H., Monod, M. & Latge, J.-P. (1995). Molecular characterisation of the Food-Borne Fungus *Neosartorya fischeri* (Malloch and Cain). *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1378-1383.

- Gröger, D. & Floss, H. G. (1998).** Biochemistry of ergot alkaloids - Achievements and challenges . *The Alkaloids, Chem. Biol.* **50**, 171-218.
- Grundmann, A., Kuznetsova, T., Afiyatullo, S. S. & Li, S.-M. (2008).** FtmPT2, an N-prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*, catalyses the last step in the biosynthesis of fumitremorgin B. *Chembiochem* **9**, 2059-2063.
- Grundmann, A. & Li, S.-M. (2005).** Overproduction, purification and characterization of FtmPT1, a brevianamide F prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* **151**, 2199-2207.
- Heide, L. (2009).** Prenyl transfer to aromatic substrates: genetics and enzymology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **13**, 171-179.
- Hermekens, P. H. H., Plate, R. & Ottenheijm, C. J. (1988).** First Total Synthesis of (-)-Verruculogen TR-2. *Tetrahedron Lett.* **29**, 1323-1324.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M. et al. (2007).** A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* **111**, 509-547.
- Hoog, G. S. (2000)** *Atlas of clinical fungi*. Utrecht: CBS.
- Horn, F., Heinekamp, T., Kniemeyer, O., Pollmächer, J., Valiante, V. & Brakhage, A. A. (2012).** System biology of fungal infection. *Front Microbiol* **3**, 108.
- Jain, H. D., Zhang, C., Zhou, S., Zhou, H. et al. (2008).** Synthesis and structure-activity relationship studies on tryprostatin A, a potent inhibitor of breast cancer resistance protein. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 4626-4651.
- Jez, J. M., Ferrer, J. L., Bowman, M. E., Dixon, R. A. & Noel, J. P. (2000).** Dissection of malonyl-coenzyme A decarboxylation from polyketide formation in the reaction mechanism of a plant polyketide synthase. *Biochemistry* **39**, 890-902.
- John, M. A. & Peberdy, J. F. (1984).** Transformation of *Aspergillus nidulans* using the *argB* gene. *Enzyme Micro. Technol.* **6**, 386-389.
- Jost, M., Zocher, G., Tarcz, S., Matuschek, M., Xie, X., Li, S.-M. & Stehle, T. (2010).** Structure-function analysis of an enzymatic prenyl transfer reaction identifies a reaction chamber with modifiable specificity. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 17849-17858.
- Jurjevic, Z., Peterson, S. W. & Horn, B. W. (2012).** *Aspergillus* section *Versicolores*: nine new species and multilocus DNA sequence based phylogeny. *IMA Fungus* **3**, 59-79.
- Kato, N., Suzuki, H., Takagi, H., Asami, Y. et al. (2009).** Identification of cytochrome P450s required for fumitremorgin biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Chembiochem* **10**, 920-928.
- Kawai, K., Nozawa, K., Yamaguchi, T., Nakajima, S. & Udagawa, S. (1992).** Two chemotypes of *Penicillium crustosum* based on the analysis of indolic components. *Mycotoxins* **36**, 19-24.
- Kozakiewicz, Z. (1989).** *Aspergillus* species on stored products. *Mycol. Papers* **161**, 1-188.

- Kozlovsky, A. G., Vinokurova, N. G., Adanin, V. M., Burkhardt, G., Dahse, H. M. & Gräfe, U. (2000). New diketopiperazine alkaloids from *Penicillium fellutanum*. *J. Nat. Prod.* **63**, 698-700.
- Kremer, A. & Li, S.-M. (2010). A tyrosine O-prenyltransferase catalyses the first pathway-specific step in the biosynthesis of sirodesmin PL. *Microbiology* **156**, 278-286.
- Kremer, A., Westrich, L. & Li, S.-M. (2007). A 7-dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus fumigatus*: overproduction, purification and biochemical characterization. *Microbiology* **153**, 3409-3416.
- Krüger, M., Sievers, N. & Fischer, R. (1997). Molekularbiologie der Sporenträgerentwicklung des Schimmelpilzes *Aspergillus nidulans*. *Biologie in unserer Zeit* **27**, 375-382.
- Kumano, T., Richard, S. B., Noel, J. P., Nishiyama, M. & Kuzuyama, T. (2008). Chemoenzymatic syntheses of prenylated aromatic small molecules using *Streptomyces* prenyltransferases with relaxed substrate specificities. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 8117-8126.
- Kuzuyama, T., Noel, J. P. & Richard, S. B. (2005). Structural basis for the promiscuous biosynthetic prenylation of aromatic natural products. *Nature* **435**, 983-987.
- Larsen, T. O., Smedsgaard, J., Nielsen, K. F., Hansen, M. A., Samson, R. A. & Frisvad, J. C. (2007). Production of mycotoxins by *Aspergillus lentulus* and other medically important and closely related species in section Fumigati. *Med. Mycol.* **45**, 225-232.
- Latge, J. P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 382-389.
- Li, G.-Y., Yang, T., Luo, Y.-G., Chen, X.-Z., Fang, D. M. & Zhang, G.-L. (2009). Brevianamide J, a new Indole alkaloid dimer from fungus *Aspergillus versicolor*. *Org. Lett.* **11**, 3714-3717.
- Li, S.-M. (2010). Prenylated indole derivatives from fungi: structure diversity, biological activities, biosynthesis and chemoenzymatic synthesis. *Nat. Prod. Rep.* **27**, 57-78.
- Li, S.-M. (2011). Genome mining and biosynthesis of fumitremorgin-type alkaloids in ascomycetes. *J. Antibiot.* **64**, 45-49.
- Li, X. J., Zhang, Q., Zhang, A. L. & Gao, J. M. (2012). Metabolites from *Aspergillus fumigatus*, an endophytic fungus associated with *Melia azedarach*, and their antifungal, antifeedant, and toxic activities. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 3424-3431.
- Liang, P. H., Ko, T. P. & Wang, A. H. (2002). Structure, mechanism and function of prenyltransferases. *Eur. J. Biochem.* **269**, 3339-3354.
- Liu, X. & Walsh, C. T. (2009). Characterization of cyclo-acetoacetyl-L-tryptophan dimethylallyltransferase in cyclopiazonic acid biosynthesis: substrate promiscuity and site directed mutagenesis studies. *Biochemistry* **48**, 11032-11044.
- Liu, X., Wang, L., Steffan, N., Yin, W.-B. & Li, S.-M. (2009). Ergot alkaloid biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: FgaAT catalyses the acetylation of fumigaclavine B. *Chembiochem* **10**, 2325-2328.

Luk, L. Y., Qian, Q. & Tanner, M. E. (2011). A cope rearrangement in the reaction catalyzed by dimethylallyltryptophan synthase? *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 12342-12345.

Luk, L. Y. P. & Tanner, M. E. (2009). Mechanism of dimethylallyltryptophan synthase: evidence for a dimethylallyl cation intermediate in an aromatic prenyltransferase reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 13932-13933.

MacNeil, D. J., Gewain, K. M., Ruby, C. L., Dezeny, G., Gibbons, P. H. & MacNeil, T. (1992). Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene* **111**, 61-68.

Madigan, M. T. & Martinko, J. M. (2006) *Brock Mikrobiologie*. München: Pearson Studium.

Mahmoodi, N. & Tanner, M. E. (2013). Potential rearrangements in the reaction catalyzed by the indole prenyltransferase FtmPT1. *Chembiochem.* **14**, 2029-2037.

Mai, P. & Li, S.-M. (2013). Alkaloids Derived from Tryptophan: A Focus on Ergot Alkaloids. In *Natural Products*, pp. 683-714. Edited by. J. M. Ramawat & J. M. Mérillon. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.

Maiya, S., Grundmann, A., Li, S.-M. & Turner, G. (2006). The fumitremorgin gene cluster of *Aspergillus fumigatus*: identification of a gene encoding brevianamide F synthetase. *Chembiochem.* **7**, 1062-1069.

Majmudar, J. D. & Gibbs, R. A. (2011). Pericyclic prenylation: Peptide modification through a Claisen rearrangement. *Chembiochem.* **12**, 2723-2726.

Mallach, D. & Cain, R. F. (1972). The Trichocomaceae: ascomycetes with *Aspergillus*, *Paecilomyces* and *Penicillium* imperfect states. *Can. J. Bot.* **50**, 2613-1628.

Matuschek, M., Wallwey, C., Wollinsky, B., Xie, X. & Li, S.-M. (2012). *In vitro* conversion of chanoclavine-I aldehyde to the stereoisomers festuclavine and pyroclavine controlled by the second reduction step. *RSC Advances* **2**, 3662-3669.

Maurer-Stroh, S., Washietl, S. & Eisenhaber, F. (2003). Protein prenyltransferases: anchor size, pseudogenes and parasites. *Biol. Chem.* **384**, 977-989.

Mbata, T. I. (2008). Isolation of fungi in hyper saline Dead Sea water. *Sudanese Journal of Public Health* **3**, 170-172.

Metzger, U., Schall, C., Zocher, G., Unsöld, I., Stec, E., Li, S.-M., Heide, L. & Stehle, T. (2009). The structure of dimethylallyl tryptophan synthase reveals a common architecture of aromatic prenyltransferases in fungi and bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106**, 14309-14314.

Mills, J. T. & Abramson, D. (1986). Production of sterigmatocystin by isolates of *Aspergillus versicolor* from western Canadian stored barley and rapeseed/canola. *Can. J. Plant Path.* **82**, 151-153.

- Mocek, U., Schultz, L., Buchan, T., Baek, C., Fretto, L., Nzerem, J., Sehl, L. & Sinha, U. (1996).** Isolation and structure elucidation of five new asterriquinones from *Aspergillus*, *Humicola* and *Botryotrichum* species. *J. Antibiot.* **49**, 854-859.
- Morino, T., Nishimoto, M., Itou, N. & Nishikiori, T. (1994).** NK372135s, novel antifungal agents produced by *Neosartoria fischeri*. *J. Antibiot.* **47**, 1546-1548.
- Müller, H., Kassack, M. U. & Wiese, M. (2004).** Comparison of the usefulness of the MTT, ATP, and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines. *J. Biomol. Screen.* **9**, 506-515.
- Mullins, J. (1994).** *Aspergillus* and *Aerobiology*. In *The genus Aspergillus*, pp. 351-359. Edited by. A. Keith, A. Howell, A. Renwick & J. F. Pedery. New York: Plenum Press.
- Mundt, K. & Li, S.-M. (2013).** CdpC2PT, a reverse prenyltransferase from *Neosartorya fischeri* with distinct substrate preference from known C2-prenyltransferases. *Microbiology* **159**, 2169-2179.
- Mundt, K., Wollinsky, B., Ruan, H. L., Zhu, T. & Li, S.-M. (2012).** Identification of the verruculogen prenyltransferase FtmPT3 by a combination of chemical, bioinformatic and biochemical approaches. *Chembiochem* **13**, 2583-2592.
- Nguyen, U. T., Goody, R. S. & Alexandrov, K. (2010).** Understanding and exploiting protein prenyltransferases. *Chembiochem.* **11**, 1194-1201.
- Nielsen, P. V., Beuchat, L. R. & Frisvad, J. C. (1988).** Growth of and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by temperature, light, and water activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1504-1510.
- Nielsen, P. V., Beuchat, L. R. & Frisvad, J. C. (1989).** Growth and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by food preservatives and organic acids. *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 197-207.
- Nierman, W. C., Pain, A., Anderson, M. J., Wortman, J. R. et al. (2005).** Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* **438**, 1151-1156.
- Noike, M., Liu, C., Ono, Y., Hamano, Y., Toyomasu, T., Sassa, T., Kato, N. & Dairi, T. (2012).** An enzyme catalyzing O-prenylation of the glucose moiety of fusicoccin A, a diterpene glucoside produced by the fungus *Phomopsis amygdali*. *Chembiochem* **13**, 566-573.
- O'Gorman, C. M., Fuller, H. T. & Dyer, P. S. (2009).** Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* **458**, 471-474.
- Perera, K. P. W. C., Day, J. B., Mantle, P. G. & Rodrigues, L. (1982).** Metabolism of verruculogen in rats. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 503-508.
- Perri, P., Campa, C., Incorvaia, C., Pareggiani, F., Lamberti, G., Costagliola, C. & Sabastian, A. (2005).** Endogenous *Aspergillus versicolor* endophthalmitis in an immuno-competent HIV-positive patient. *Mycopathologia* **160**, 259-261.

- Pitt, J. I. & Hocking, A. D. (2009) *Fungi and Food Spoilage*. London: Springer Verlag.
- Pockrandt, D. & Li, S.-M. (2013). Geranylation of cyclic dipeptides by the dimethylallyl transferase AnaPT resulting in a shift of prenylation position on the indole ring. *Chembiochem*. **14**, 2023-2028.
- Pockrandt, D., Ludwig, L., Fan, A., König, G. M. & Li, S.-M. (2012). New insights into the biosynthesis of prenylated xanthenes: XptB from *Aspergillus nidulans* catalyses an O-prenylation of xanthenes. *Chembiochem* **13**, 2764-2771.
- Pockrandt, D., Sack, C., Kosiol, T. & Li, S.-M. (2014). A promiscuous prenyltransferase from *Aspergillus oryzae* catalyses C-prenylations of hydroxynaphthalenes in the presence of different prenyl donors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Doi:10.1007/s00253-014-5509-x.
- Pojer, F., Wemakor, E., Kammerer, B., Chen, H., Walsh, C. T., Li, S.-M. & Heide, L. (2003). CloQ, a prenyltransferase involved in clorobiocin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 2316-2321.
- Proksa, B., Uhrin, D., Liptaj, T. & Šturdíková, M. (1998). Neosartorin, an ergochrome biosynthesized by *Neosartorya fischeri*. *Phytochemistry* **48**, 1161-1164.
- Qian, Q., Schultz, A. W., Moore, B. S. & Tanner, M. E. (2012). Mechanistic studies on CymD: A tryptophan reverse N-prenyltransferase. *Biochemistry* **51**, 7733-7739.
- Raju, R., Piggott, A. M., Huang, X. C. & Capon, R. J. (2011). Nocardioazines: a novel bridged diketopiperazine scaffold from a marine-derived bacterium inhibits p-glycoprotein. *Org. Lett.* **13**, 2770-2773.
- Raper, K. B. & Fennell, D. I. (1965) *The genus Aspergilli*. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Reshetilova, T. A., Solovyeva, T. F., Basunov, B. P. & Kozlovsky, A. G. (1995). Study of the alkaloid composition of the food-infecting penicillies. *Food Addit. Contam.* **12**, 461-466.
- Rigbers, O. & Li, S.-M. (2008). Ergot alkaloid biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: overproduction and biochemical characterisation of a 4-dimethylallyltryptophan N-methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **283**, 26859-26868.
- Rubtsov, A. M. & Lopina, O. D. (2000). Ankyrins. *FEBS Lett.* **29**, 1-5.
- Rundberget, T., Skaar, I. & Flåøyen, A. (2004). The presence of *Penicillium* and *Penicillium* mycotoxins in food wastes. *Int. J. Food Microbiol.* **90**, 181-188.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samson, R. A., Hoekstra, E. S. & Frisvad J.C. (2004) *Introduction to food- and airborne fungi*. CBS.
- Samson, R. A., Hong, S., Peterson, S. W., Frisvad, J. C. & Varga, J. (2007). Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section Fumigati and its teleomorph *Neosartorya*. *Stud. Mycol.* **59**, 147-203.

- Samson, R. A., Houbraken, J., Summerbell, R. C., Flannigan, B. & Miller, J. D. (2001).** Common and important species of fungi and actinomycetes in indoor environments. In *Microorganisms in Home and Indoor Work Environments*, pp. 287-292. Edited by. B. Flannigan, R. A. Samson & J. D. Miller. London: Taylor and Francis.
- Sanz-Cervera, J. F., Stocking, E. M., Usui, T., Osada, H. & Williams, R. M. (2000).** Synthesis and Evaluation of Microtubule Assembly Inhibition and Cytotoxicity of Prenylated Derivatives of cyclo-L-Trp-L-Pro. *Bioorg. & Med. Chem.* **8**, 2407-2415.
- Schultz, A. W., Lewis, C. A., Luzung, M. R., Baran, P. S. & Moore, B. S. (2010).** Functional characterization of the cyclomarin/cyclomarazine prenyltransferase CymD directs the biosynthesis of unnatural cyclic peptides. *J. Nat. Prod.* **73**, 373-377.
- Shankar, J. (2013).** An overview of Toxins in *Aspergillus* associated with pathogenesis. *Int. J. LifeSc. Biot & Pharm. Res.* **2**, 16-31.
- Slack, G. J., Puniani, E., Frisvad, J. C., Samson, R. A. & Miller, J. D. (2009).** Secondary metabolites from *Eurotium* species, *Aspergillus calidoustus* and *A. insuetus* common in Canadian homes with a review of their chemistry and biological activities. *Mycol. Res.* **113**, 480-490.
- Sosa, M. J., Córdoba, J. J., Díaz, C., Rodríguez, M., Bermúdez, E., Asensio, M. A. & Núñez, F. (2002).** Production of cyclopiazonic acid by *Penicillium commune* isolated from dry-cured ham on a meat extract-based substrate. *J. Food Protection* **65**, 988-992.
- Steffan, N., Grundmann, A., Afiyatullo, A., Ruan, H. & Li, S.-M. (2009).** FtmOx1, a non heme Fe(II) and alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase, catalyses the endoperoxide formation of verruculogen in *Aspergillus fumigatus*. *Org. Biomol. Chem.* **7**, 4082-4087.
- Steffan, N. & Li, S.-M. (2009).** Increasing structure diversity of prenylated diketopiperazine derivatives by using a 4-dimethylallyltryptophan synthase. *Arch. Microbiol.* **191**, 461-466.
- Takahashi, S., Takagi, H., Toyoda, A., Uramoto, M., Nogawa, T., Ueki, M., Sakaki, Y. & Osada, H. (2010).** Biochemical characterization of a novel indole prenyltransferase from *Streptomyces* sp. SN-593. *J. Bacteriol.* **192**, 2839-2851.
- Tarcz, S., Ludwig, L. & Li, S.-M. (2014).** AstPT catalyses both reverse N1- and regular C2-prenylation of a methylated bisindolyl benzoquinone. *Chembiochem.* **15**, 108-116.
- Tello, M., Kuzuyama, T., Heide, L., Noel, J. P. & Richard, S. B. (2008).** The ABBA family of aromatic prenyltransferases: broadening natural product diversity. *Cell Mol. Life Sci.* **65**, 1459-1463.
- Thom, C. (1910).** Cultural studies of species of *Penicillium*. *U. S. D. A. Bureau of Animal Industry Bulletin* **118**, 1-107.
- Thom, C. & Church, M. B. (1926)** *The Aspergilli*. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Thom, C. & Raper, K. B. (1945)** *Manual of the Aspergilli*. Baltimore: Williams & Wilkins.

- Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G. G., Zabicky-Zissman, J. H., Lockington, R. A. & Davies, R. W. (1983).** Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **26**, 205-221.
- Timberlake, W. E. & Marshall, M. A. (1989).** Genetic engineering of filamentous fungi. *Science* **244**, 1317.
- Tiraboschi, V. (1908).** *Aspergillus versicolor*. *Annali Bot.* **7**, 9.
- Tsunematsu, Y., Ishikawa, N., Wakana, D., Goda, Y., Noguchi, H., Moriya, H., Hotta, K. H. & Watanabe, K. (2013).** Distinct mechanisms for spiro-carbon formation reveal biosynthetic pathway crosstalk. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 818-825.
- Unsöld, I. A. (2006).** Molecular biological and biochemical investigations on the biosynthesis of fumigaclavines in *Aspergillus fumigatus* AF 293 / B 5233 and *Penicillium commune* NRRL2033. *Dissertation Universität Tübingen*.
- Unsöld, I. A. & Li, S.-M. (2005).** Overproduction, purification and characterization of FgaPT2, a dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* **151**, 1499-1505.
- Unsöld, I. A. & Li, S.-M. (2006).** Reverse prenyltransferase in the biosynthesis of fumigaclavine C in *Aspergillus fumigatus*: gene expression, purification and characterization of fumigaclavine C synthase FgaPT1. *Chembiochem* **7**, 158-164.
- Varga, J., Vida, Z., Tóth, B., Debets, F. & Horie, Y. (2000).** Phylogenetic analysis of newly described *Neosarorya* species. *Anat. van Leeuw.* **77**, 235-239.
- Vinokurova, N. G., Boichenko, L. V. & Arinbasarov, M. U. (2003a).** Production of alkaloids by fungi of the genus *Penicillium* grown on wheat grain. *Appl. Biochem. Microbiol.* **39**, 403-406.
- Vinokurova, N. G., Ozerskaya, S. M., Baskunov, B. P. & Arinbasarov, M. U. (2003b).** The *Penicillium commune* Thom and *Penicillium clavigerum* demelius fungi producing fumigaclavines A and B. *Microbiology (Moscow)* **72**, 149-151.
- Vuillemin, P. (1927).** Sartorya, nouveau genre de Plectascinéés angiocarpes. *C. R. Acad. Sci.* **184**, 136-137.
- Wagener, R. E., Davis, N. D. & Diener, U. L. (1980).** Penitrem A and roquefortine production by *Penicillium commune*. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**, 882-887.
- Wallwey, C., Matuschek, M. & Li, S.-M. (2010).** Ergot alkaloid biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: conversion of chanoclavine-I to chanoclavine-I aldehyde catalyzed by a short-chain alcohol dehydrogenase FgaDH. *Arch. Microbiol.* **192**, 127-134.
- Walsh, C. T., Haynes, S. W., Ames, B. D., Gao, X. & Tang, Y. (2013).** Short pathways to complexity generation: Fungal peptidyl alkaloid multicyclic scaffolds from anthranilate building blocks. *ACS Chem. Biol.* **8**, 1366-1382.
- Wang, F., Fang, Y., Zhu, T., Zhang, M., Lin, A., Gu, Q. & Zhu, W. (2008).** Seven new prenylated indole diketopiperazine alkaloids from holothurian-derived fungus *Aspergillus fumigatus*. *Tetrahedron* **64**, 7986-7991.

Wang, L., Yin, W.-B., Li, S.-M. & Liu, X.-Q. (2009). Chemoenzymatic synthesis of prenylated indole alkaloids. *Chin. J. Biochem. Mol. Biol.* **25**, 580-584.

Webster, J. & Weber, R. W. S. (2007) *Introduction to fungi*. Cambridge University Press.

Willingale, J., Perera, K. P. & Mantle, P. G. (1983). An intermediary role for the tremorgenic mycotoxin TR-2 in the biosynthesis of verruculogen. *Biochem. J.* **214**, 991-993.

Winkelblech, J. & Li, S.-M. (2014). Biochemical investigations of two 6-DMATS enzymes from *Streptomyces* revealing novel features of L-tryptophan prenyltransferases. *Chembiochem.* **15**, DOI: 10.1002/cbic.201400046.

Winter, G. (1884). Pilze - Ascomyceten. In *Rabenhorst's Kryptogamen-Flora*, pp. 1-192. Kummer, Leipzig.

Wollinsky, B., Ludwig, L., Hamacher, A., Yu, X., Kassack, M. U. & Li, S.-M. (2012a). Prenylation at the indole ring leads to a significant increase of cytotoxicity of tryptophan-containing cyclic dipeptides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 3866-3869.

Wollinsky, B., Ludwig, L., Xie, X. & Li, S.-M. (2012b). Breaking the regioselectivity of indole prenyltransferases: identification of regular C3-prenylated hexahydropyrrolo[2,3-b]indoles as side products of the regular C2-prenyltransferase FtmPT1. *Org. Biomol. Chem.* **10**, 9262-9270.

Wong, S. M., Musza, L. L., Kydd, G. C., Kullnig, R., Gillum, A. M. & Cooper, R. (1993). Fiscalins: new substance P inhibitors produced by the fungus *Neosartorya fischeri*. Taxonomy, fermentation, structures, and biological properties. *J. Antibiot.* **46**, 545-553.

Wülfing, C., Lombardero, J. & Plückthun, A. (1994). An *Escherichia coli* protein consisting of a domain homologous to FK506-binding protein (FKBP) and a new metal binding motif. *J. Biol. Chem.* **269**, 2895-2901.

Yamamoto, Y., Kiriya, N., Shimizu, S. & Koshimura, S. (1976a). Antitumor activity of asterriquinone, a metabolic product from *Aspergillus terreus*. *Gann* **67**, 623-624.

Yamamoto, Y., Nishimura, K. & Kiriya, N. (1976b). Studies on the metabolic products of *Aspergillus terreus*. I. Metabolites of the strain IFO 6123. *Chem. Pharm. Bull.* **24**, 1853-1859.

Yamazaki, M., Fujimoto, H. & Kawasaki, T. (1980). Chemistry of tremorgenic metabolites. I. Fumitremogin A from *Aspergillus fumigatus*. *Chem. Pharm. Bull.* **28**, 245-254.

Yin, S., Yu, X., Wang, Q., Liu, X. Q. & Li, S.-M. (2013). Identification of a brevianamide F reverse prenyltransferase BrePT from *Aspergillus versicolor* with a broad substrate specificity towards tryptophan-containing cyclic dipeptides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 1649-1660.

Yin, W.-B., Cheng, J. & Li, S.-M. (2009a). Stereospecific synthesis of aszonalenins by using two recombinant prenyltransferases. *Org. Biomol. Chem.* **7**, 2202-2207.

Yin, W.-B., Grundmann, A., Cheng, J. & Li, S.-M. (2009b). Acetylaszonalenin biosynthesis in *Neosartorya fischeri*: Identification of the biosynthetic gene cluster by genomic mining and functional proof of the genes by biochemical investigation. *J. Biol. Chem.* **284**, 100-109.

- Yin, W.-B., Ruan, H.-L., Westrich, L., Grundmann, A. & Li, S.-M. (2007).** CdpNPT, an N-prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*: overproduction, purification and biochemical characterisation. *Chembiochem* **8**, 1154-1161.
- Yin, W.-B., Xie, X.-L., Matuschek, M. & Li, S.-M. (2010a).** Reconstruction of pyrrolo[2,3-b]indoles carrying an α -configured reverse C3-dimethylallyl moiety by using recombinant enzymes. *Org. Biomol. Chem.* **8**, 1133-1141.
- Yin, W.-B., Yu, X., Xie, X.-L. & Li, S.-M. (2010b).** Preparation of pyrrolo[2,3-b]indoles carrying a β -configured reverse C3-dimethylallyl moiety by using a recombinant prenyltransferase CdpC3PT. *Org. Biomol. Chem.* **8**, 2430-2438.
- Yu, X., Yang, A., Lin, W. & Li, S.-M. (2012a).** Friedel-Crafts alkylation on indolocarbazoles catalyzed by two dimethylallyltryptophan synthases from *Aspergillus*. *Tetrahedron Lett.* **53**, 6861-6864.
- Yu, X. & Li, S.-M. (2011).** Prenylation of flavonoids by using a dimethylallyltryptophan synthase 7-DMATS from *Aspergillus fumigatus*. *Chembiochem* **12**, 2280-2283.
- Yu, X., Liu, Y., Xie, X., Zheng, X.-D. & Li, S.-M. (2012b).** Biochemical characterization of indole prenyltransferases: Filling the last gap of prenylation positions by a 5-dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus clavatus*. *J. Biol. Chem.* **287**, 1371-1380.
- Yu, X., Xie, X. & Li, S.-M. (2011).** Substrate promiscuity of secondary metabolite enzymes: prenylation of hydroxynaphthalenes by fungal indole prenyltransferases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **92**, 737-748.
- Yu, X., Zocher, G., Xie, X., Liebhold, M., Schütz, S., Stehle, T. & Li, S.-M. (2013).** Catalytic mechanism of stereospecific formation of *cis*-configured prenylated pyrroloindoline diketopiperazines by indole prenyltransferases. *Chem. Biol.* **20**, 1492-1501.
- Zhang, M., Wang, W.-L., Fang, Y.-C., Zhu, T.-J., Gu, Q.-Q. & Zhu, W.-M. (2008).** Cytotoxic alkaloids and antibiotic nordammarane triterpenoids from the marine-derived fungus *Aspergillus sydowi*. *J. Nat. Prod.* **71**, 985-989.
- Zhao, S., Smith, K. S., Deveau, A. M., Dieckhaus, C. M., Johnson, M. A., Macdonald, T. L. & Cook, J. M. (2002).** Biological activity of the tryprostatins and their diastereomers on human carcinoma cell lines. *J. Med. Chem.* **45**, 1559-1562.
- Zou, H., Zheng, X. & Li, S.-M. (2009).** Substrate promiscuity of the cyclic dipeptide prenyltransferases from *Aspergillus fumigatus*. *J. Nat. Prod.* **72**, 44-52.
- Zou, H.-X., Xie, X., Zheng, X.-D. & Li, S.-M. (2011).** The tyrosine O-prenyltransferase SirD catalyzes O-, N-, and C-prenylations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**, 1443-1451.
- Zou, H.-X., Xie, X.-L., Linne, U., Zheng, X.-D. & Li, S.-M. (2010).** Simultaneous C7- and N1-prenylation of cyclo-L-Trp-L-Trp catalyzed by a prenyltransferase from *Aspergillus oryzae*. *Org. Biomol. Chem.* **8**, 3037-3044.

6. Anhang

6.1. NMR-Spektren der Syntheseprodukte

6.1.1. *cyclo*-D-Trp-D-Pro

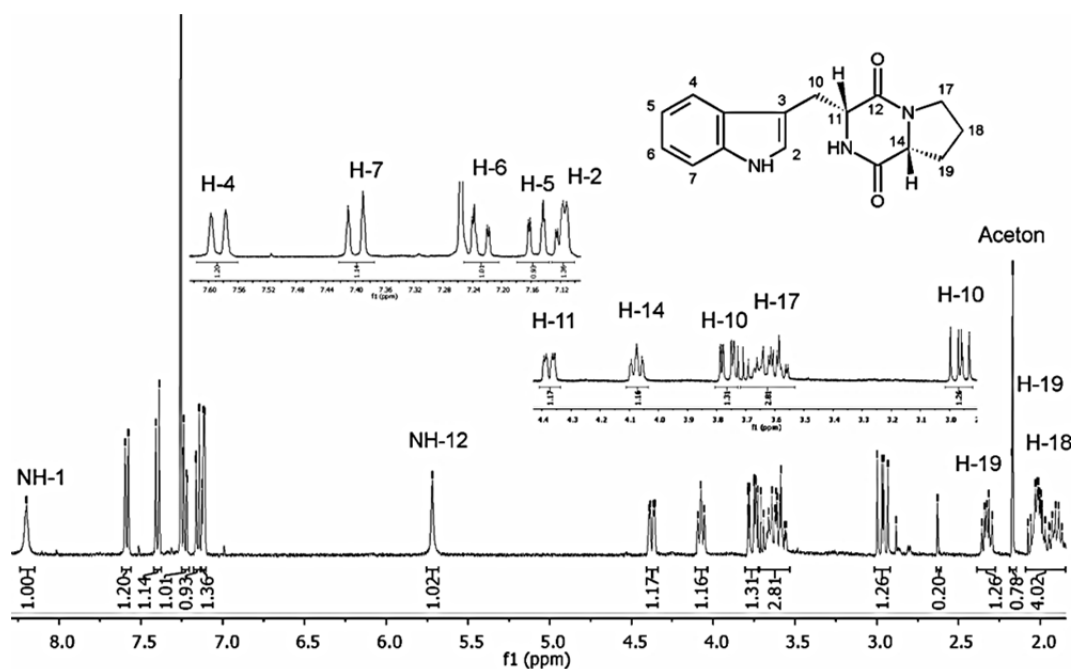


Abbildung 6-1: ^1H -NMR-Spektrum von *cyclo*-D-Trp-D-Pro in CDCl_3 (500 MHz)

6.1.2. *cyclo*-D-Trp-L-Pro

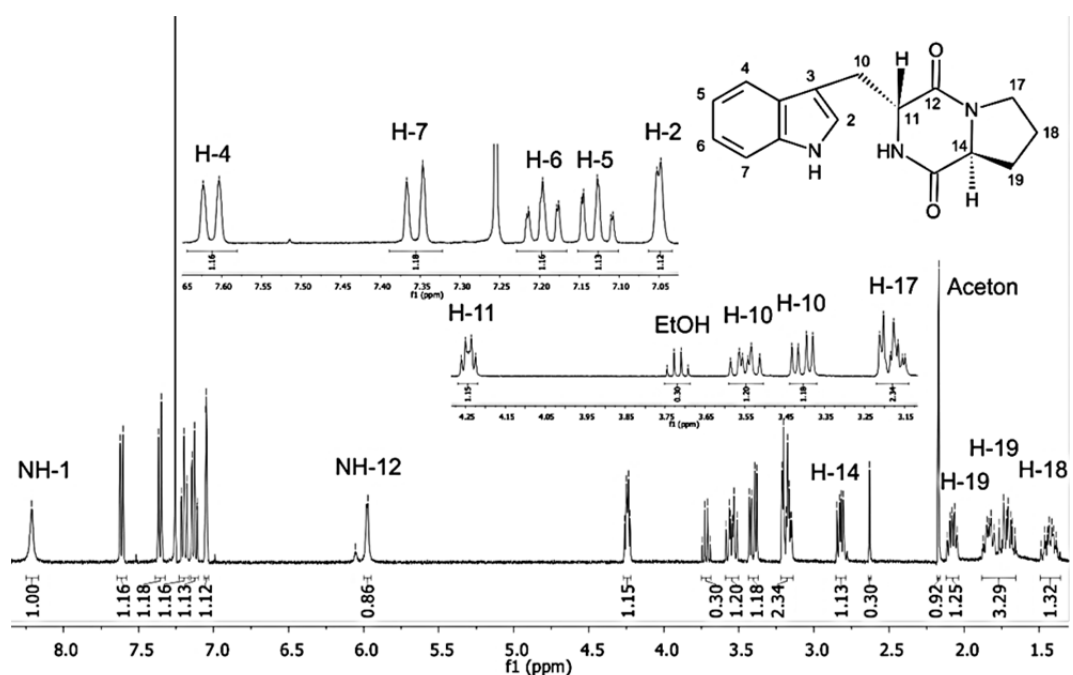


Abbildung 6-2: ^1H -NMR-Spektrum von *cyclo*-D-Trp-L-Pro in CDCl_3 (500 MHz)

6.2. NMR und ESI-MS-Spektren der regulär C2-prenylierten FtmPT1 Produkte (b-Reihe)

6.2.1. *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-L-Pro (1b)

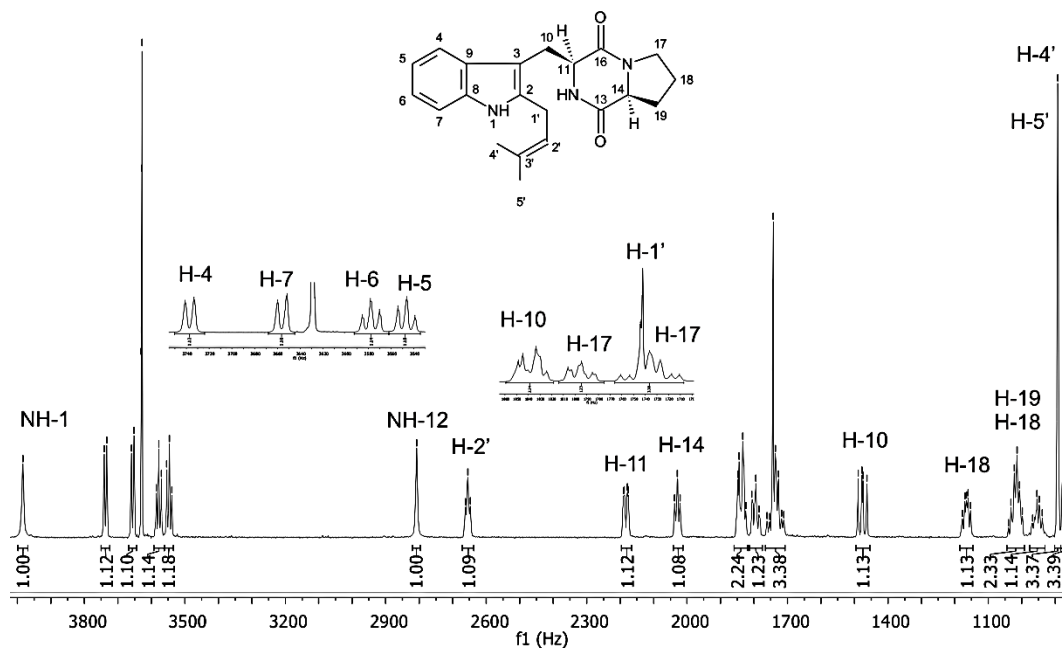


Abbildung 6-3: ^1H -NMR-Spektrum von *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-L-Pro (1b) in CDCl_3 (500 MHz)

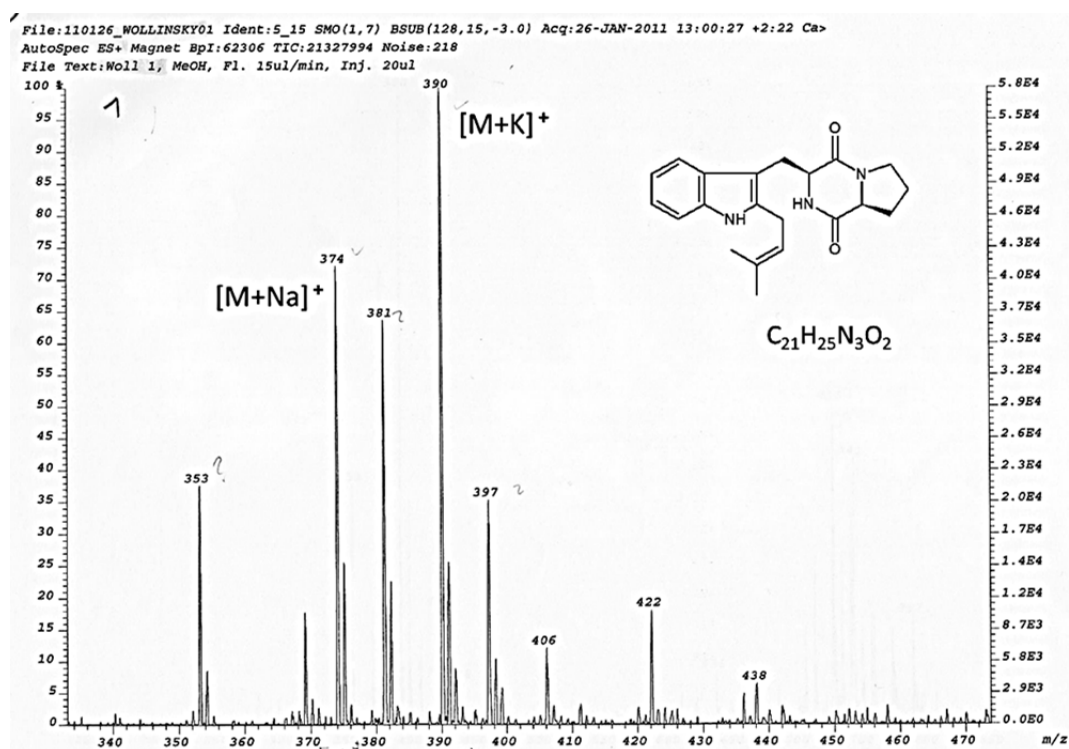
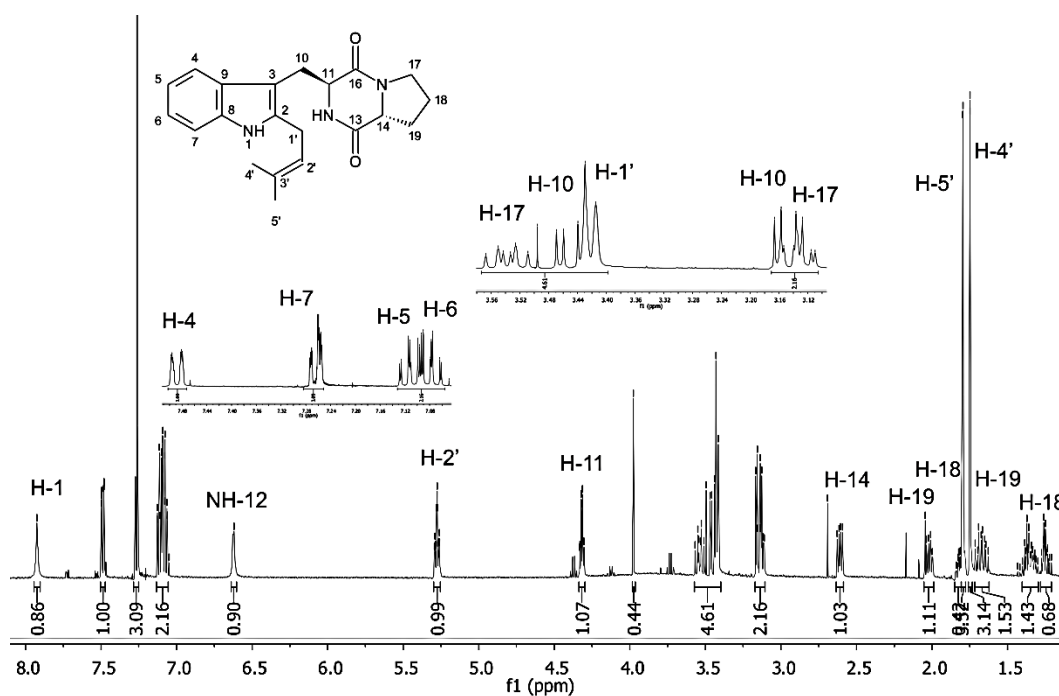
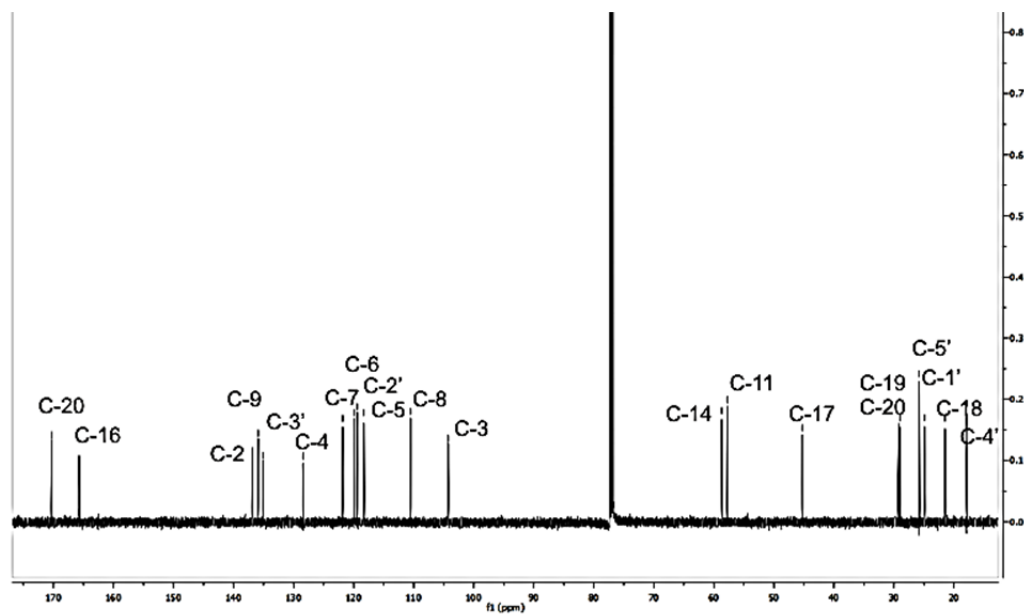


Abbildung 6-4: ESI-MS-Spektrum von *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-L-Pro (1b)

6.2.2. *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-D-Pro (2b)Abbildung 6-5: ^1H -NMR-Spektrum von *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-D-Pro (2b) in CDCl_3 (500 MHz)Abbildung 6-6: ^{13}C -Spektrum von *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-D-Pro (2b) in CDCl_3 (500 MHz)

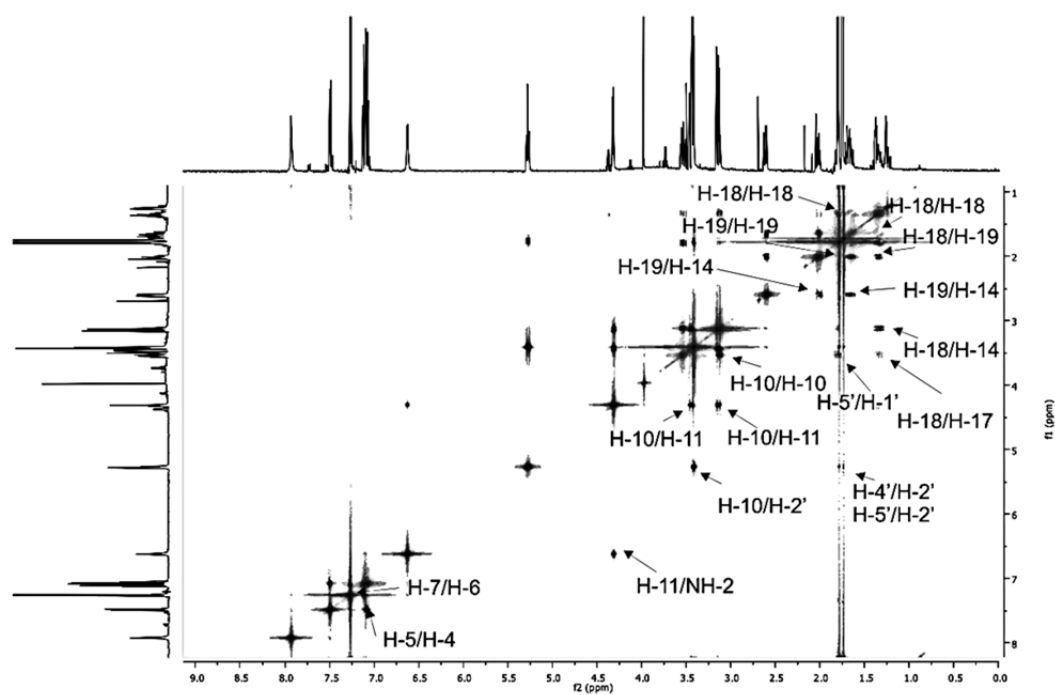


Abbildung 6-7: COSY-Spektrum von *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-D-Pro (2b) in CDCl_3 (500 MHz)

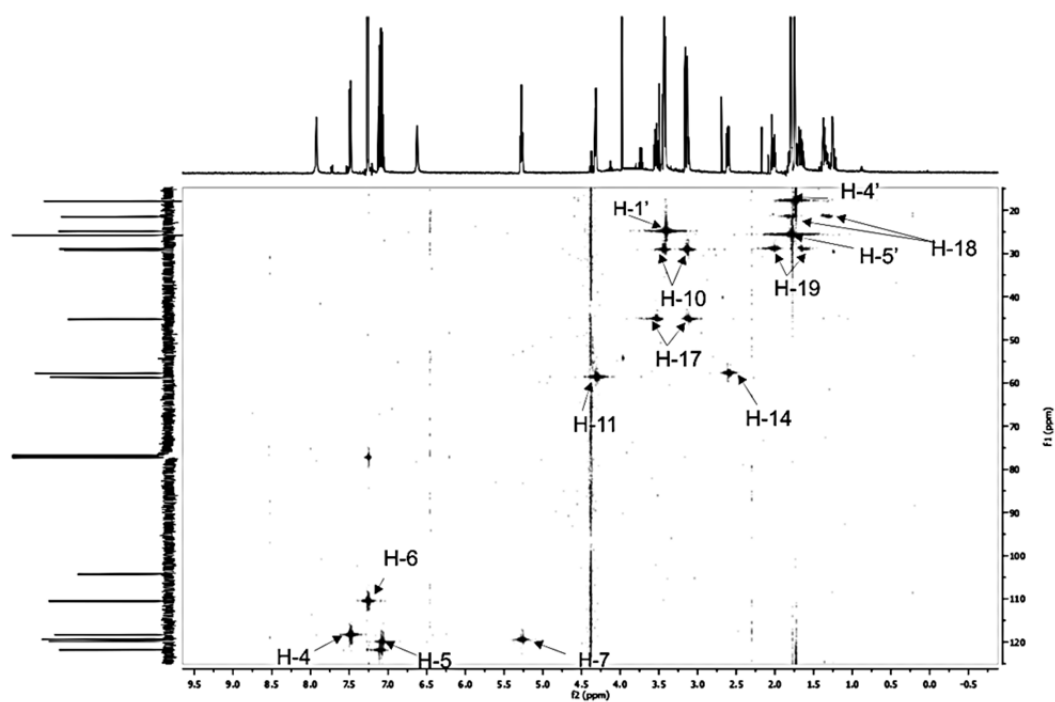
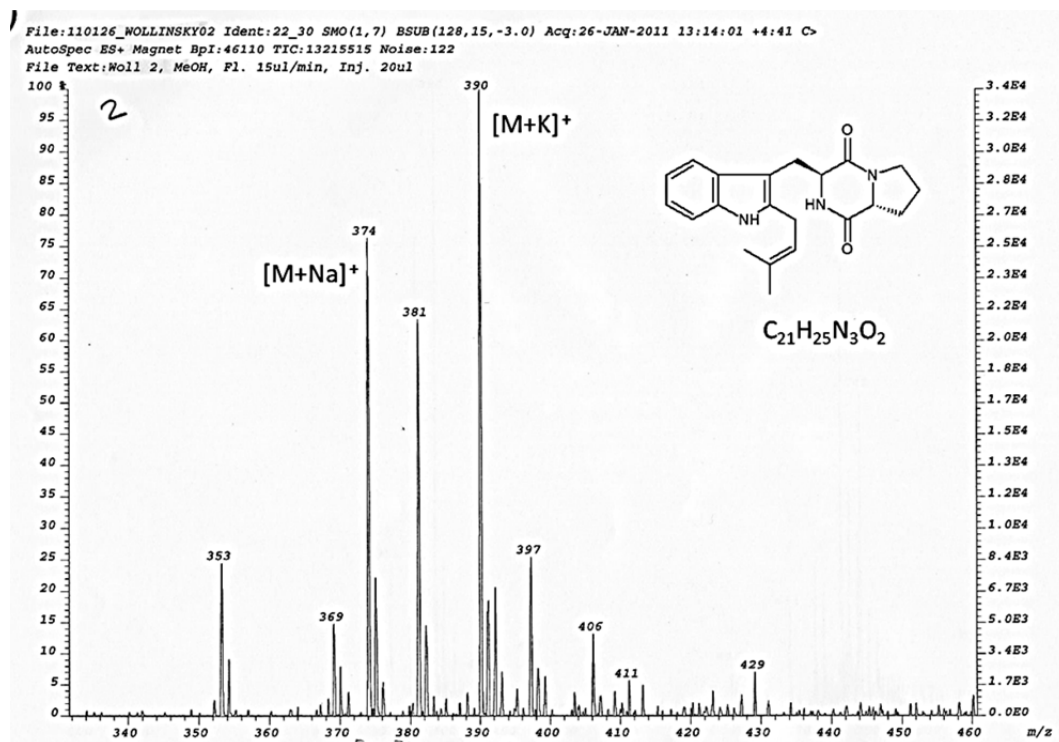
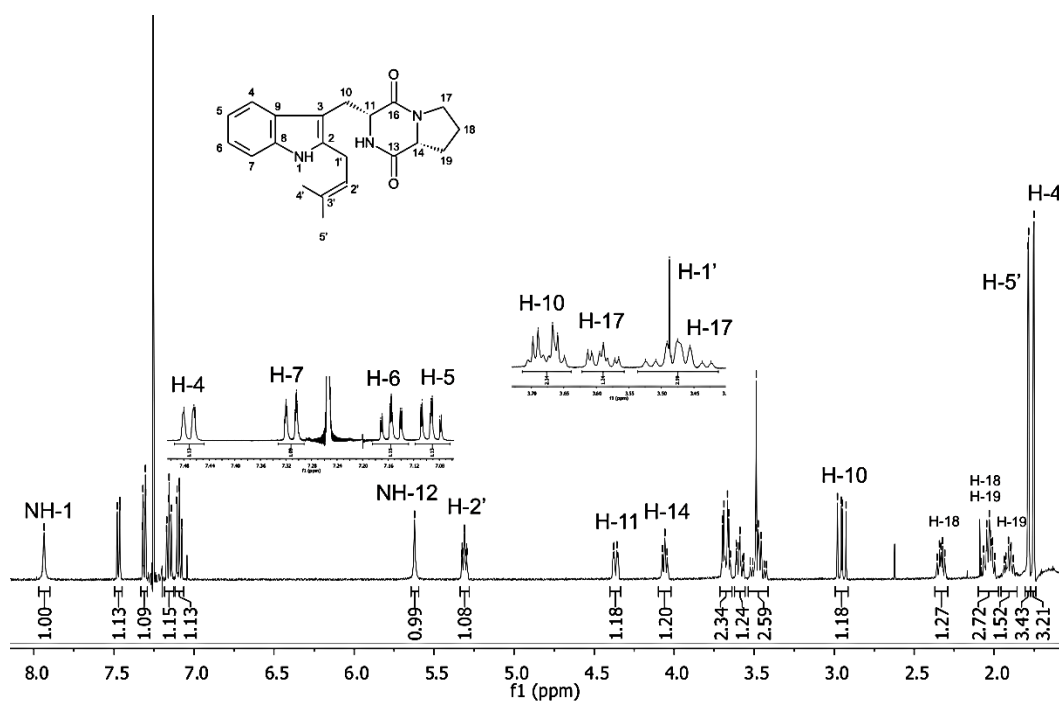
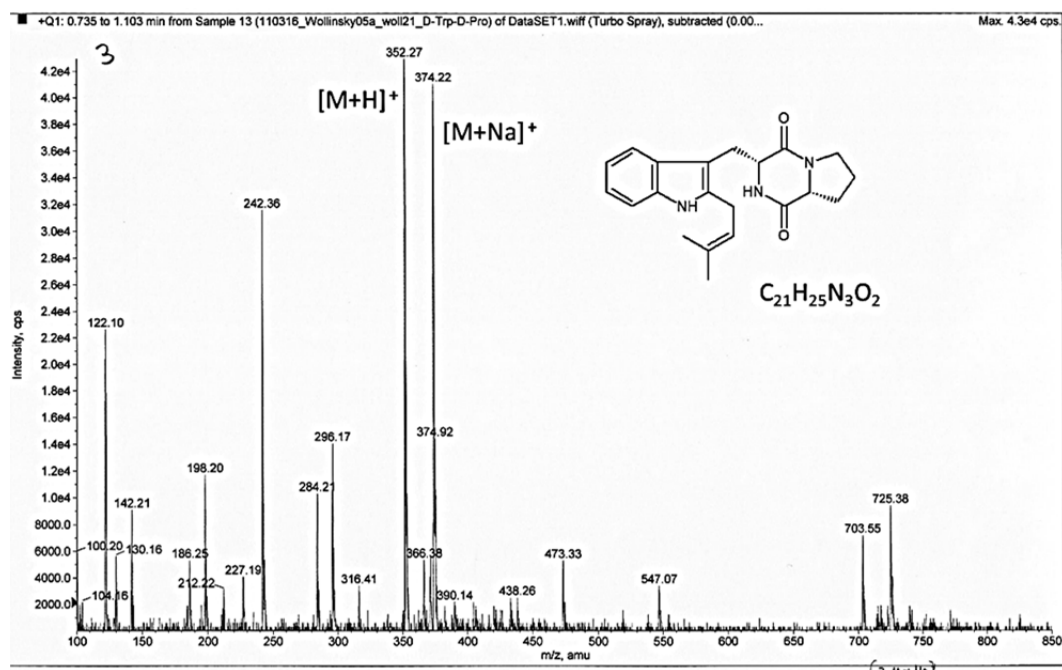
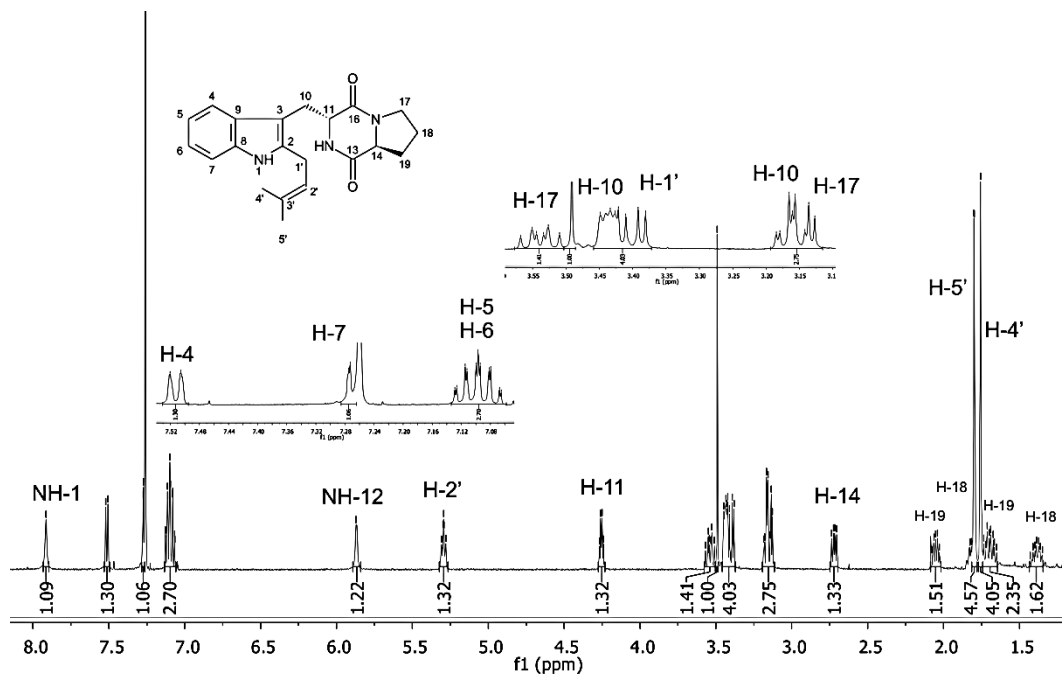


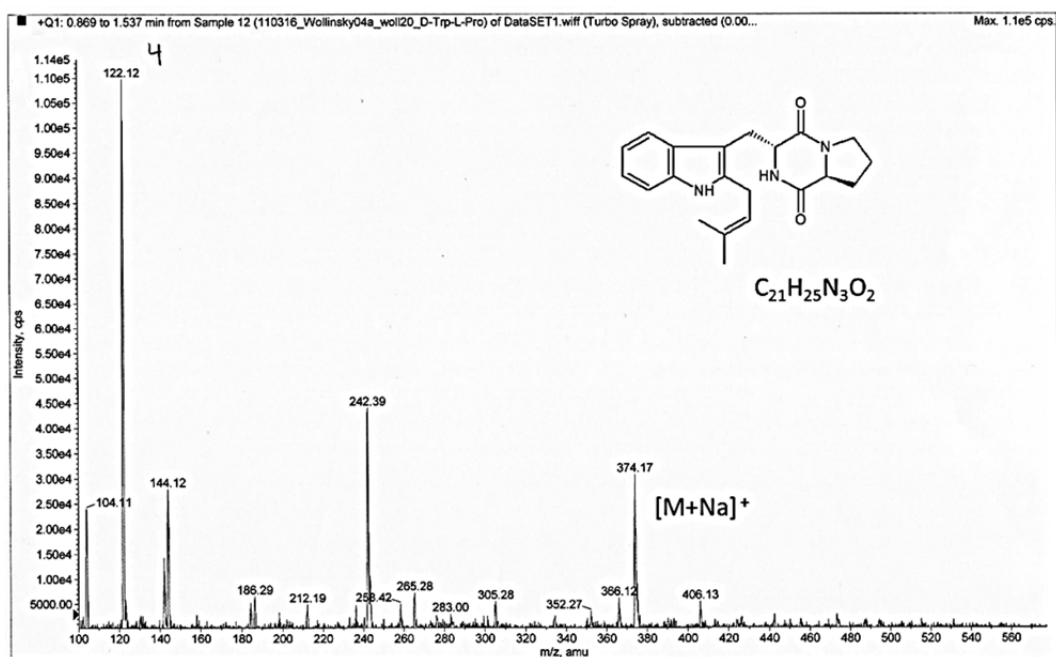
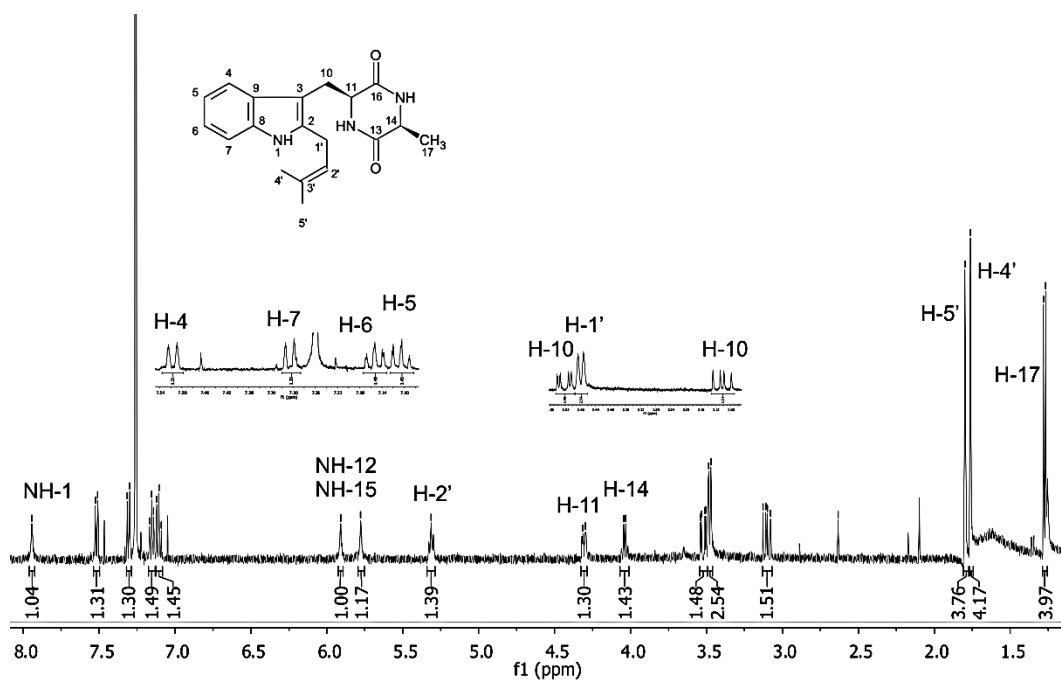
Abbildung 6-8: HMQC-Spektrum von *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-D-Pro (2b) in CDCl_3 (500 MHz)

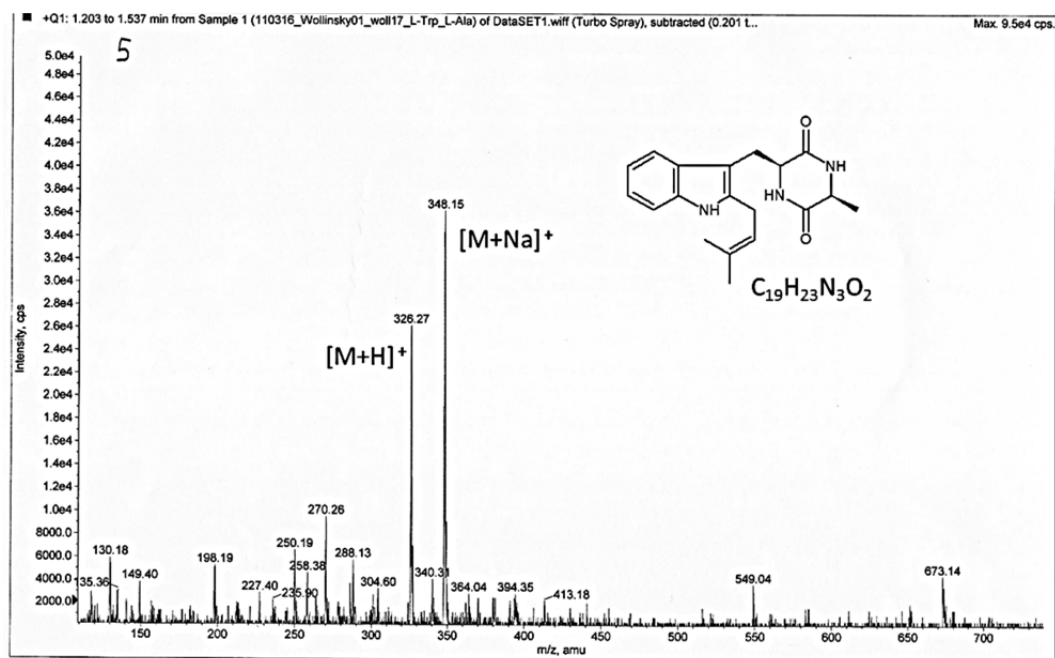
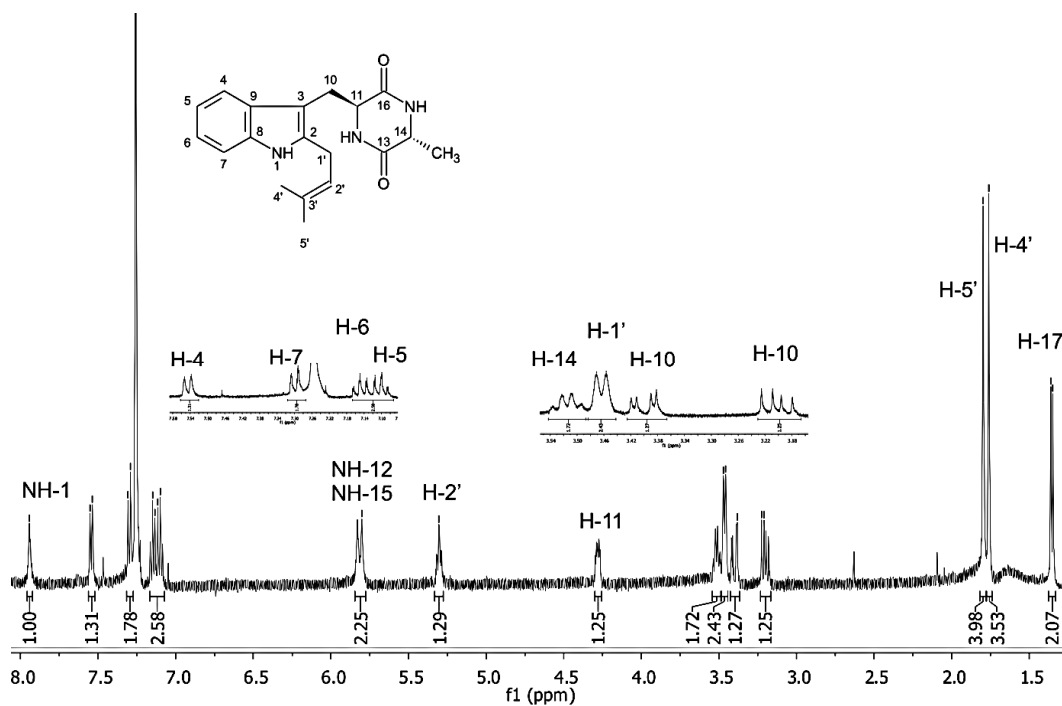
Abbildung 6-9: ESI-MS-Spektrum von *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-D-Pro (2b)6.2.3. *cyclo*-C2-dimethylallyl-D-Trp-D-Pro (3b)Abbildung 6-10: ¹H-NMR-Spektrum von *cyclo*-C2-dimethylallyl-D-Trp-D-Pro (3b) in CDCl₃ (500 MHz)

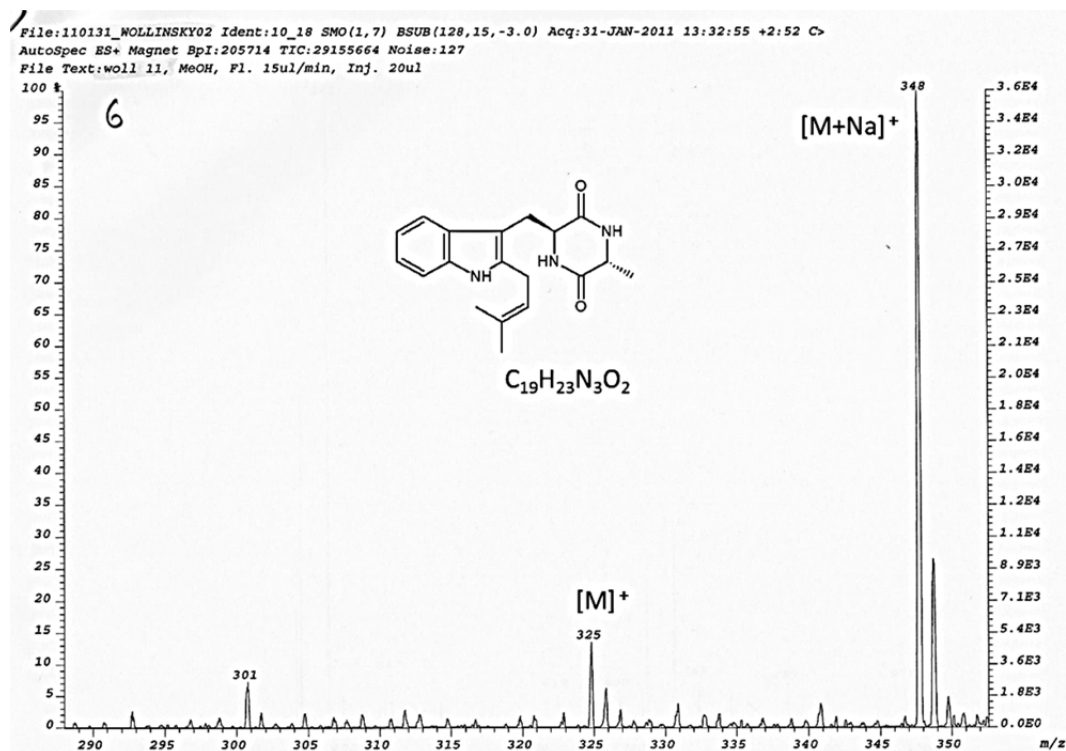
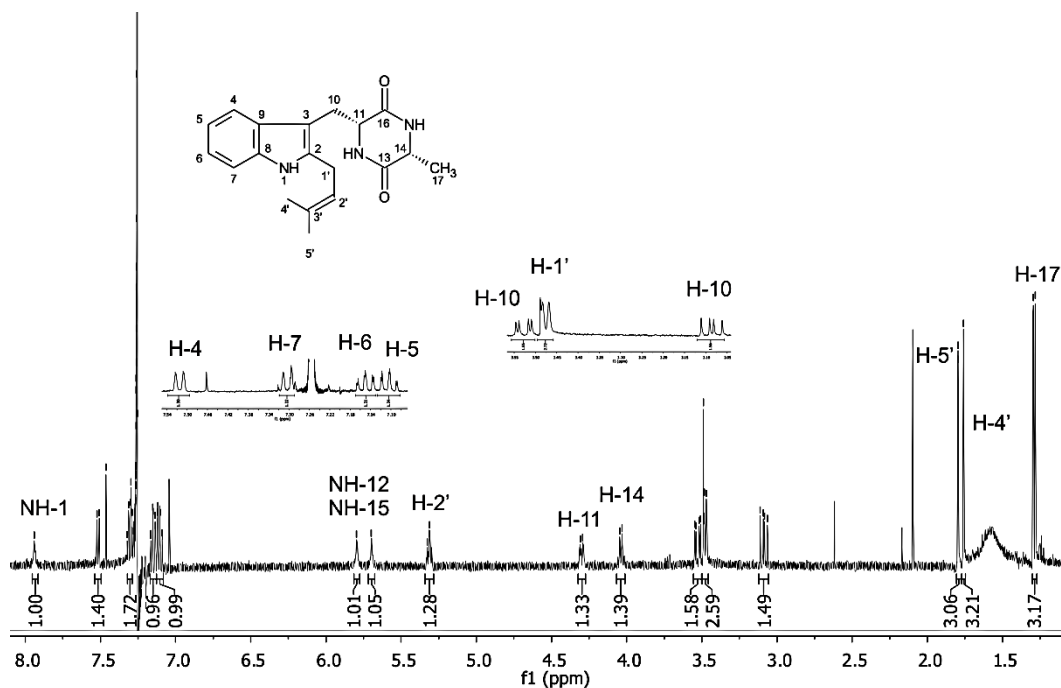


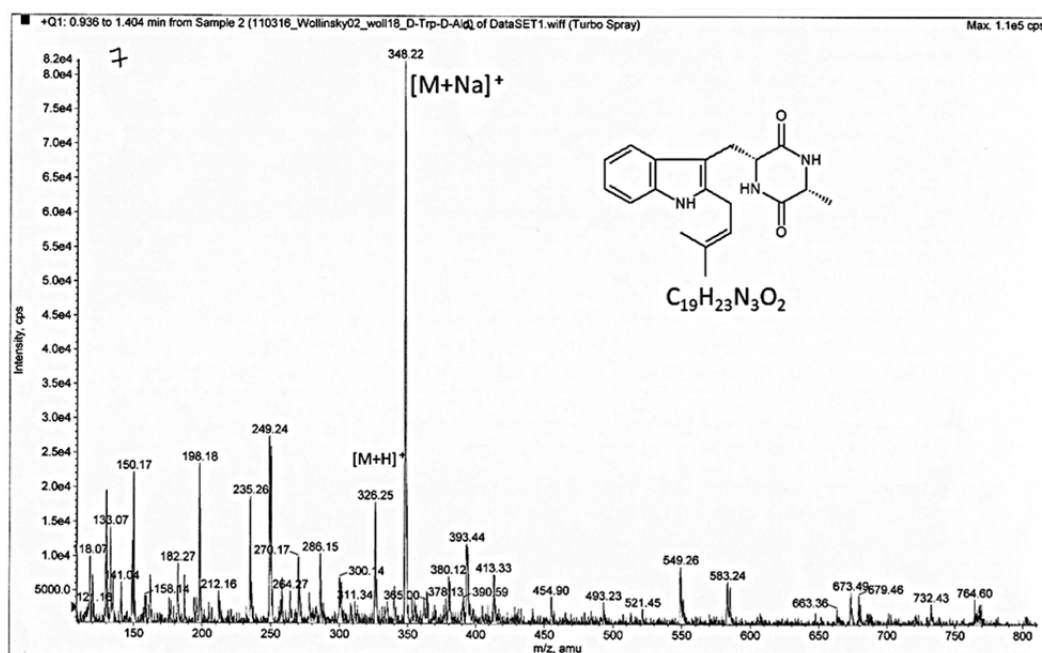
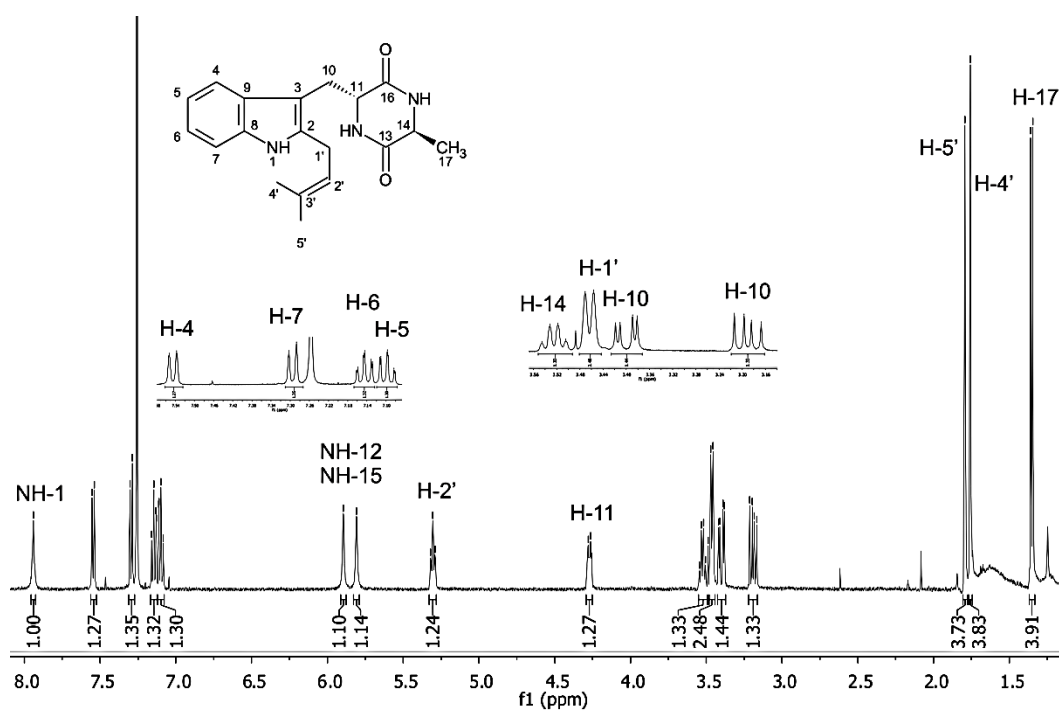
6.2.4. *cyclo*-C2-dimethylallyl-D-Trp-L-Pro (4b)

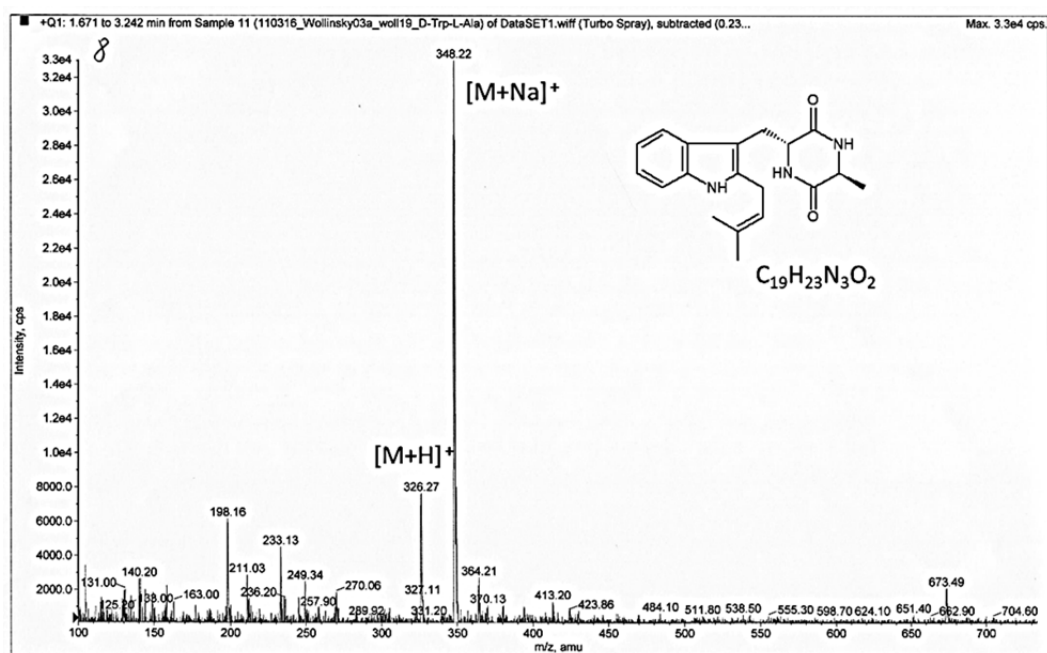
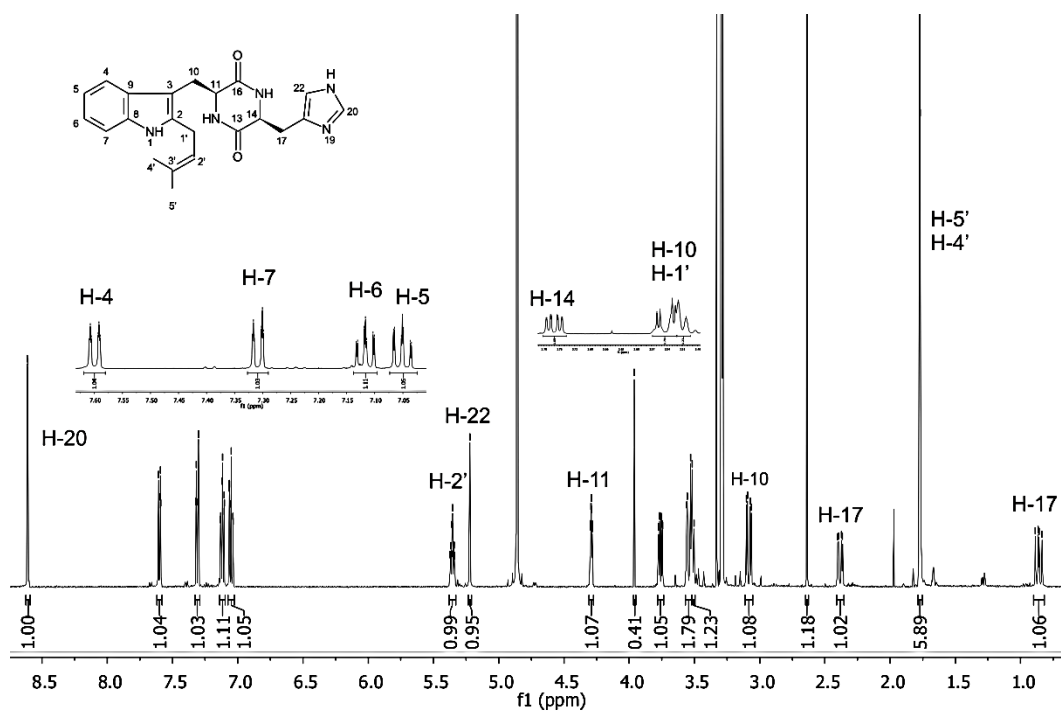


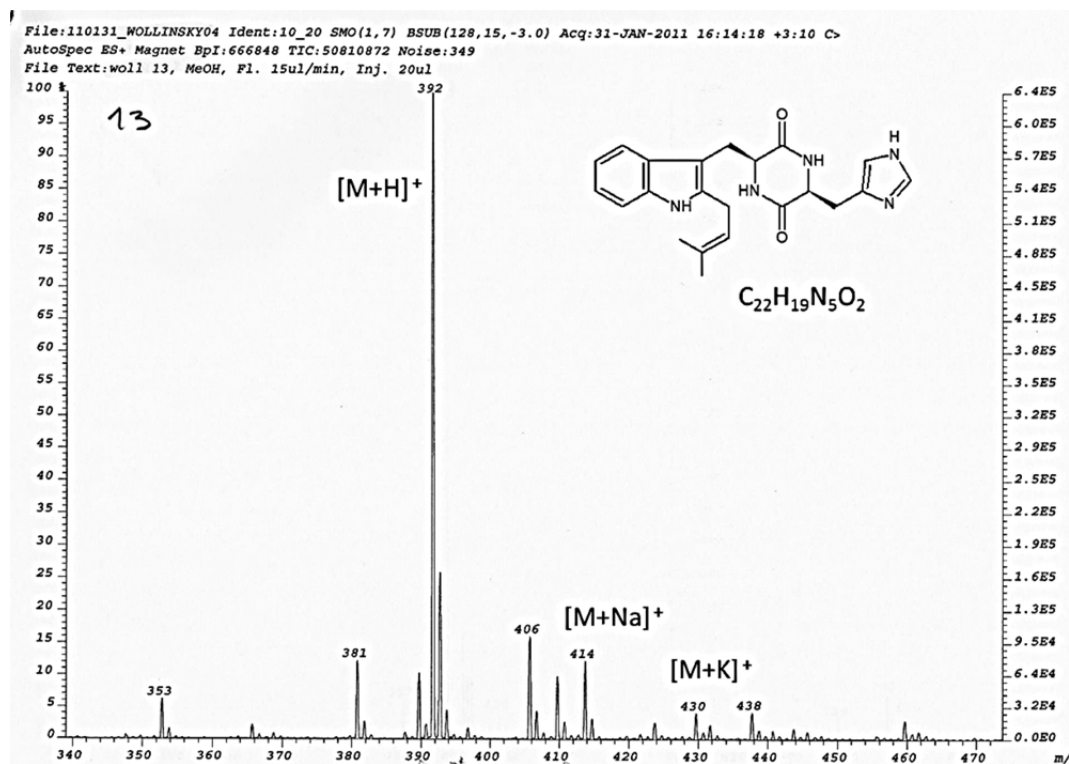
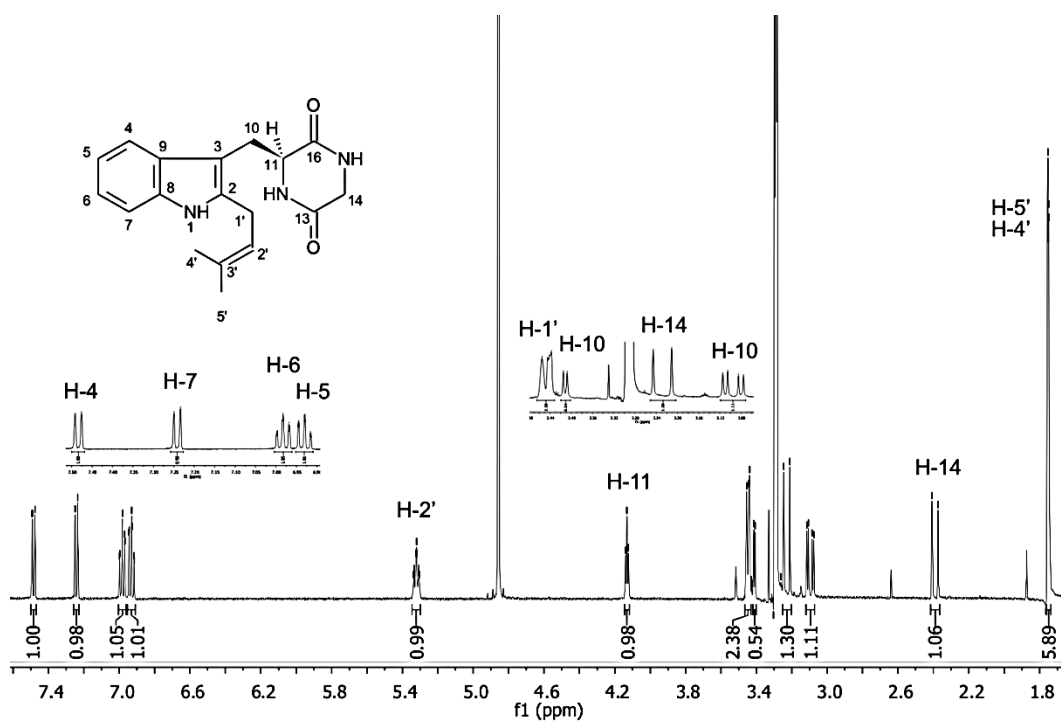
Abbildung 6-13: ESI-MS-Spektrum von *cyclo*-C2-dimethylallyl-D-Trp-L-Pro (4b)6.2.5. *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-L-Ala (5b)Abbildung 6-14: ^1H -NMR-Spektrum von *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-L-Ala (5b)

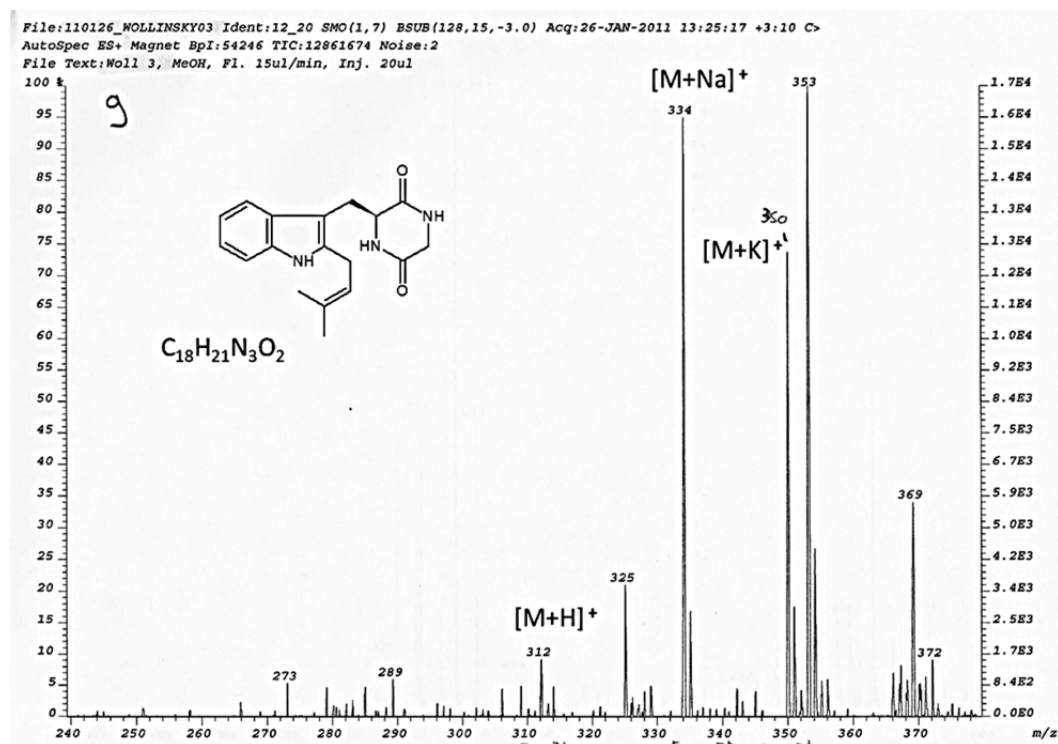
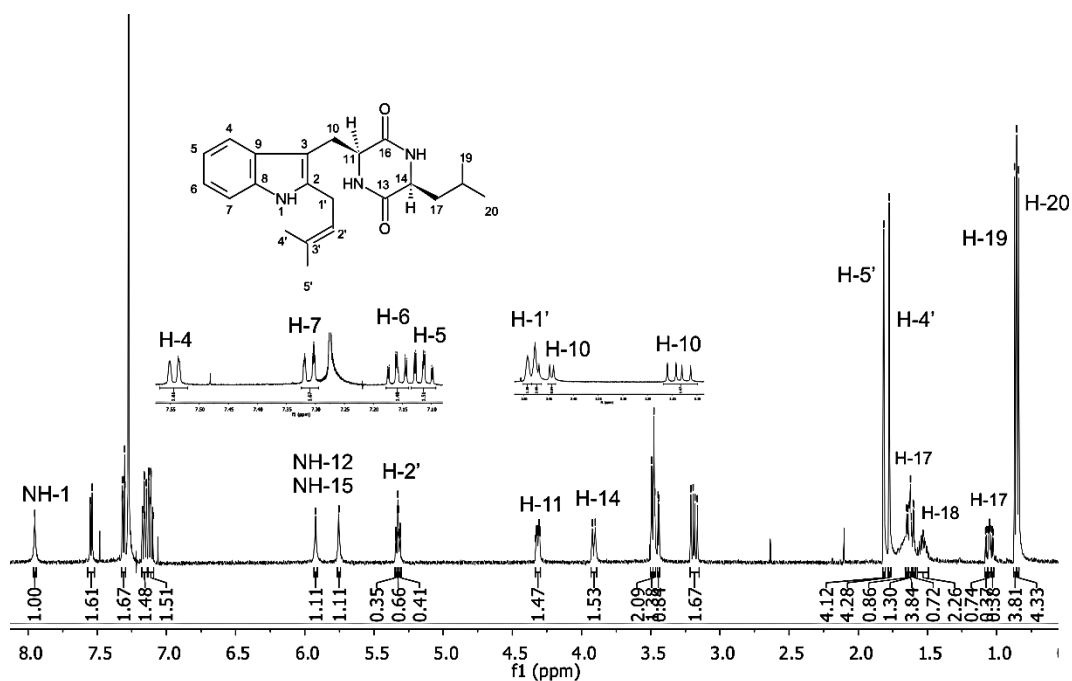
Abbildung 6-15: ESI-MS-Spektrum von *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-L-Ala (5b)6.2.6. *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-D-Ala (6b)Abbildung 6-16: ^1H -NMR-Spektrum von *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-D-Ala (6b)

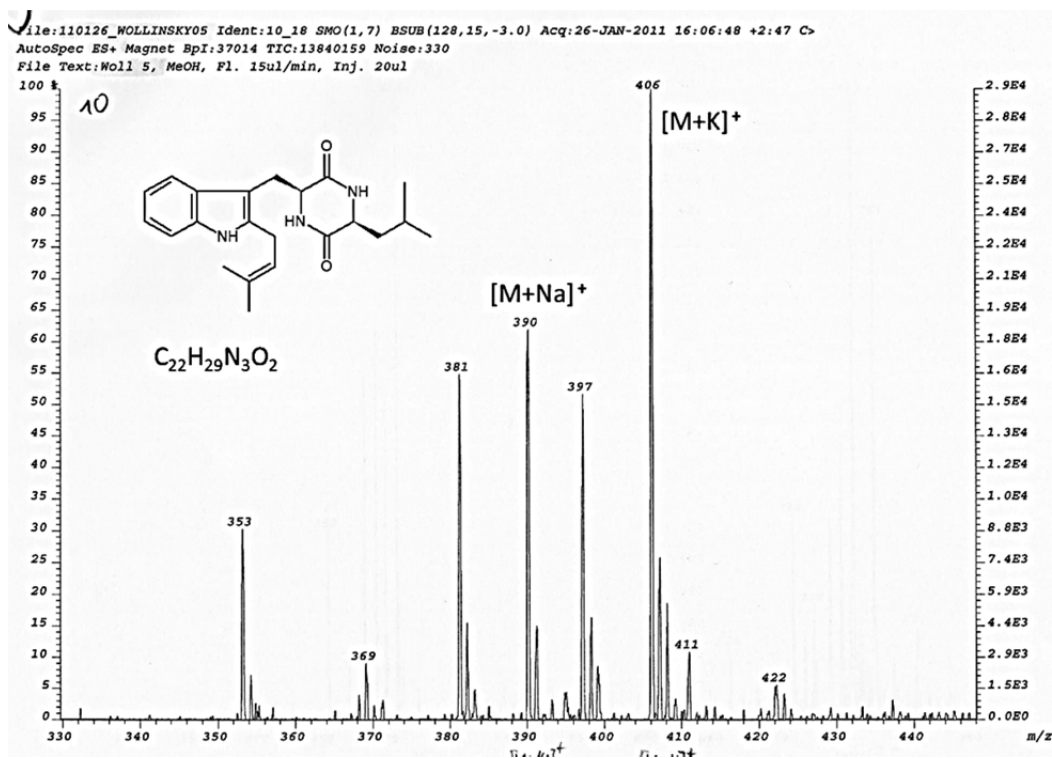
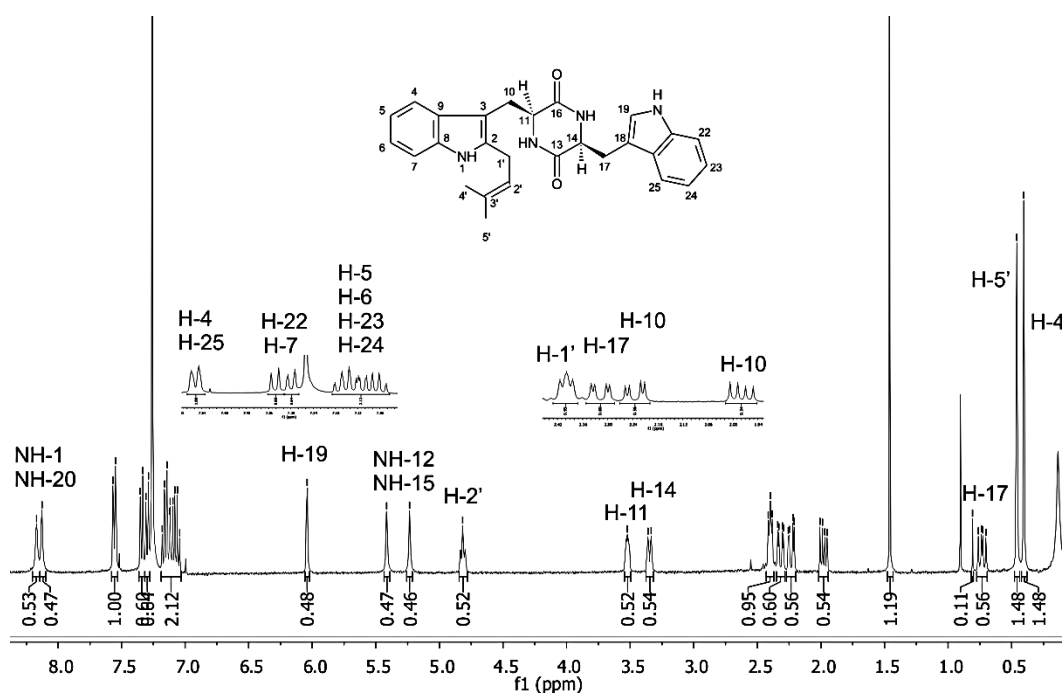
Abbildung 6-17: ESI-MS-Spektrum von *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-D-Ala (6b)6.2.7. *cyclo*-C2-dimethylallyl-D-Trp-D-Ala (7b)Abbildung 6-18: ¹H-NMR-Spektrum von *cyclo*-C2-dimethylallyl-D-Trp-D-Ala (7b)

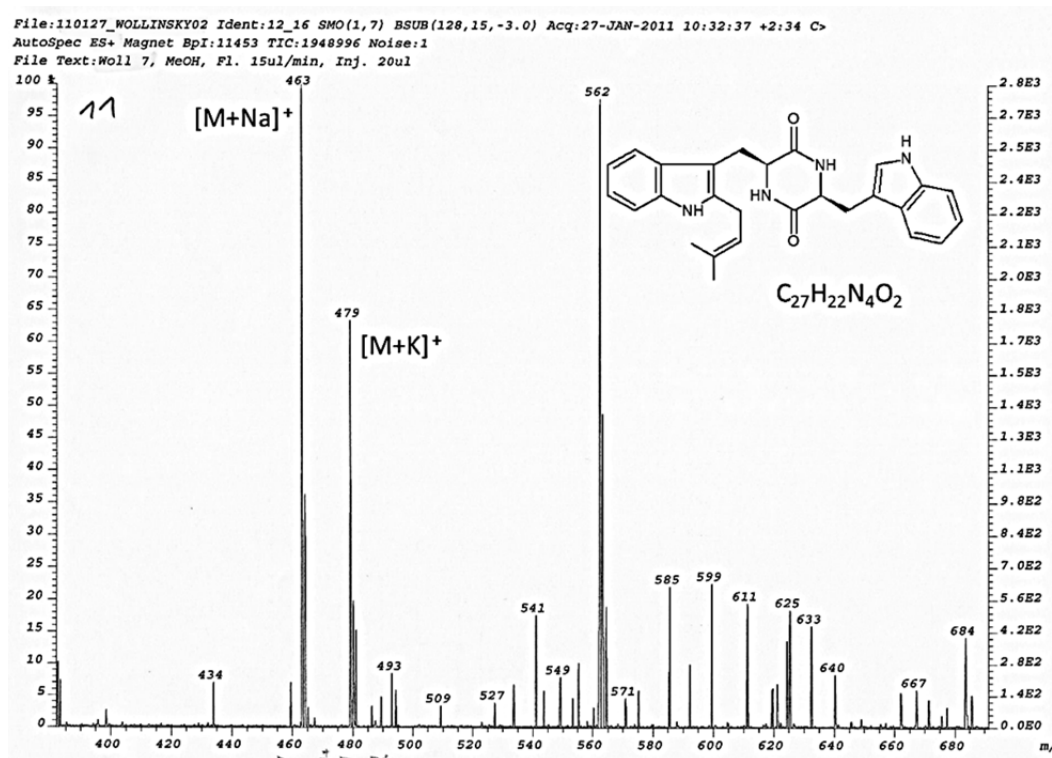
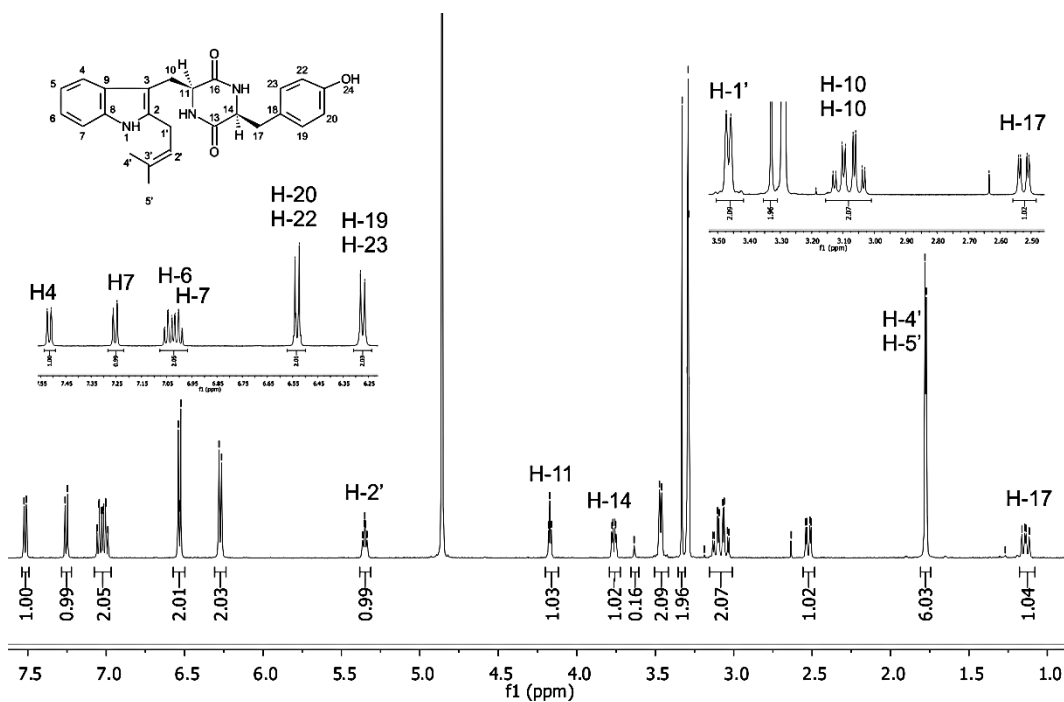
Abbildung 6-19: ESI-MS-Spektrum von *cyclo*-C2-dimethylallyl-D-Trp-D-Ala (7b)6.2.8. *cyclo*-C2-dimethylallyl-D-Trp-L-Ala (8b)Abbildung 6-20: 1H -NMR-Spektrum von *cyclo*-C2-dimethylallyl-D-Trp-L-Ala (8b)

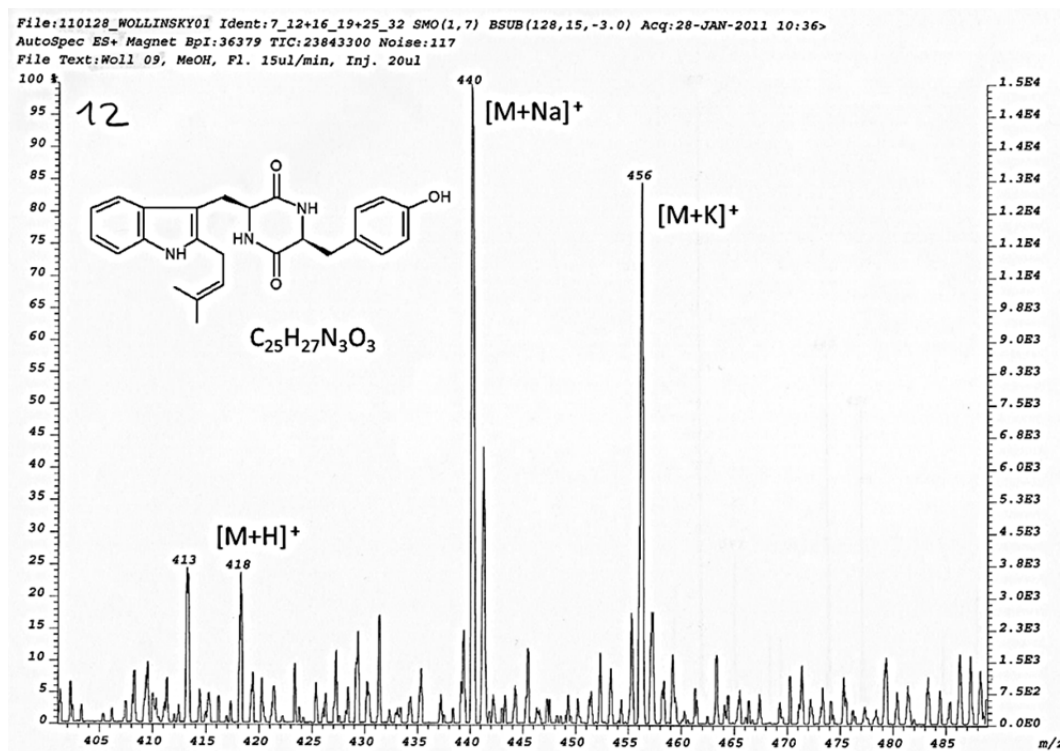
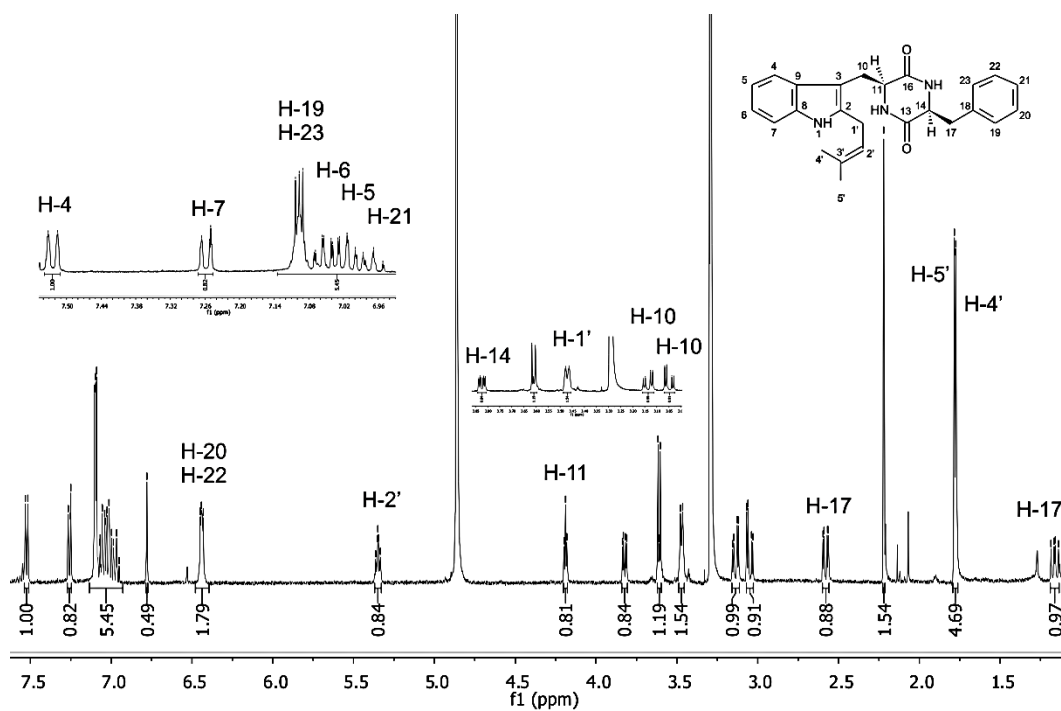
Abbildung 6-21: ESI-MS-Spektrum von *cyclo*-C2-dimethylallyl-D-Trp-L-Ala (8b)6.2.9. *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-L-His (9b)Abbildung 6-22: 1H -NMR-Spektrum von *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-L-His (9b) in CD_3OD (500 MHz)

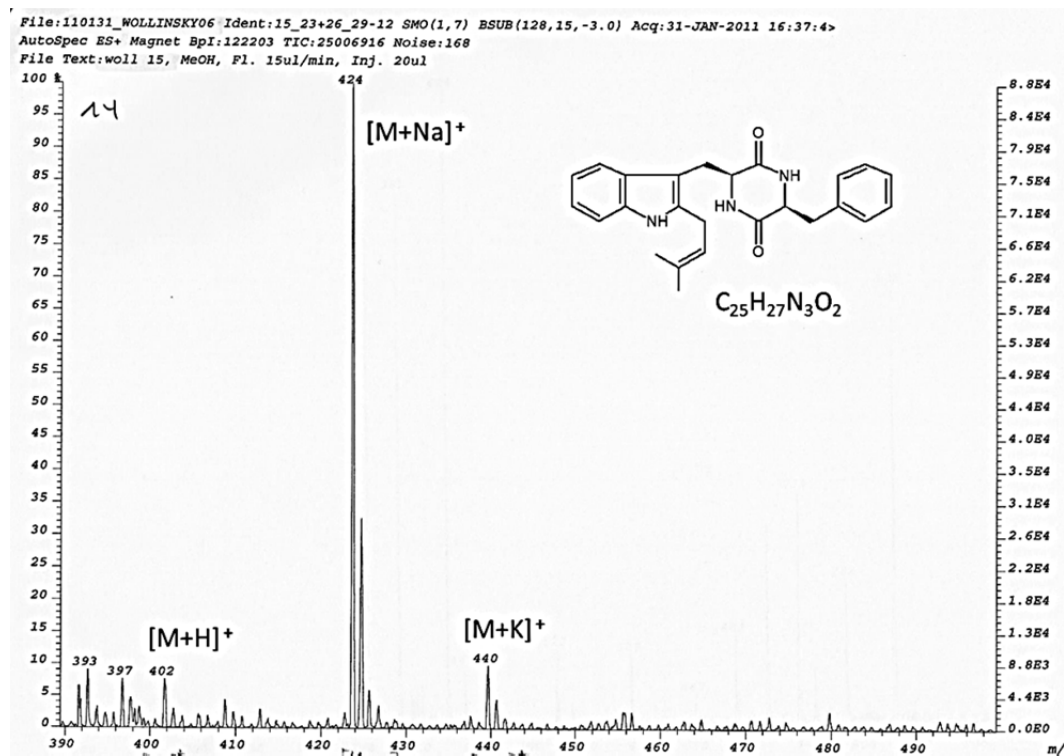
Abbildung 6-23: ESI-MS-Spektrum von *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-L-His (9b)6.2.10. *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-Gly (10b)Abbildung 6-24: 1H -NMR-Spektrum von *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-Gly (10b) in CD_3OD (500 MHz)

Abbildung 6-25: ESI-MS-Spektrum von *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-Gly (10b)6.2.11. *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-L-Leu (11b)Abbildung 6-26: ¹H-NMR-Spektrum von *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-L-Leu (11b) in CDCl₃ (500 MHz)

Abbildung 6-27: ESI-MS-Spektrum von *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-L-Leu (11b)6.2.12. *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-L-Trp (12b)Abbildung 6-28: 1H -NMR-Spektrum von *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-L-Trp (12b) in $CDCl_3$ (500 MHz)

Abbildung 6-29: ESI-MS-Spektrum von *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-L-Trp (12b)6.2.13. *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-L-Tyr (13b)Abbildung 6-30: ^1H -NMR-Spektrum von *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-L-Tyr (13b) in CD_3OD (500 MHz)

Abbildung 6-31: ESI-MS-Spektrum von *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-L-Tyr (13b)6.2.14. *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-L-Phe (14b)Abbildung 6-32: ^1H -NMR-Spektrum von *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-L-Phe (14b) in CD_3OD (500 MHz)

Abbildung 6-33: ESI-MS-Spektrum von *cyclo*-C2-dimethylallyl-L-Trp-L-Phe (14b)

6.3. NMR und ESI-MS-Spektren der regulär C3-prenylierten FtmPT1 Produkte (c-Reihe)

6.3.1. *cyclo*-C3 α -dimethylallyl-D-Trp-D-Pro (3c)

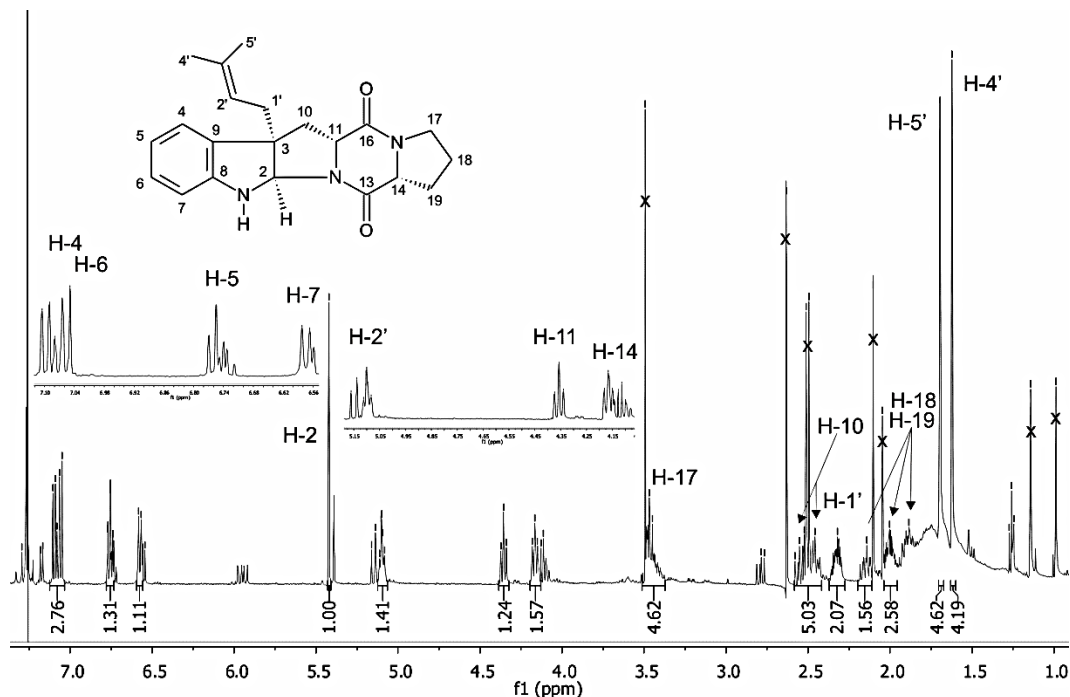


Abbildung 6-34: ^1H -NMR-Spektrum von *cyclo*-C3 α -dimethylallyl-D-Trp-D-Pro (3c) in CDCl_3 (500 MHz)

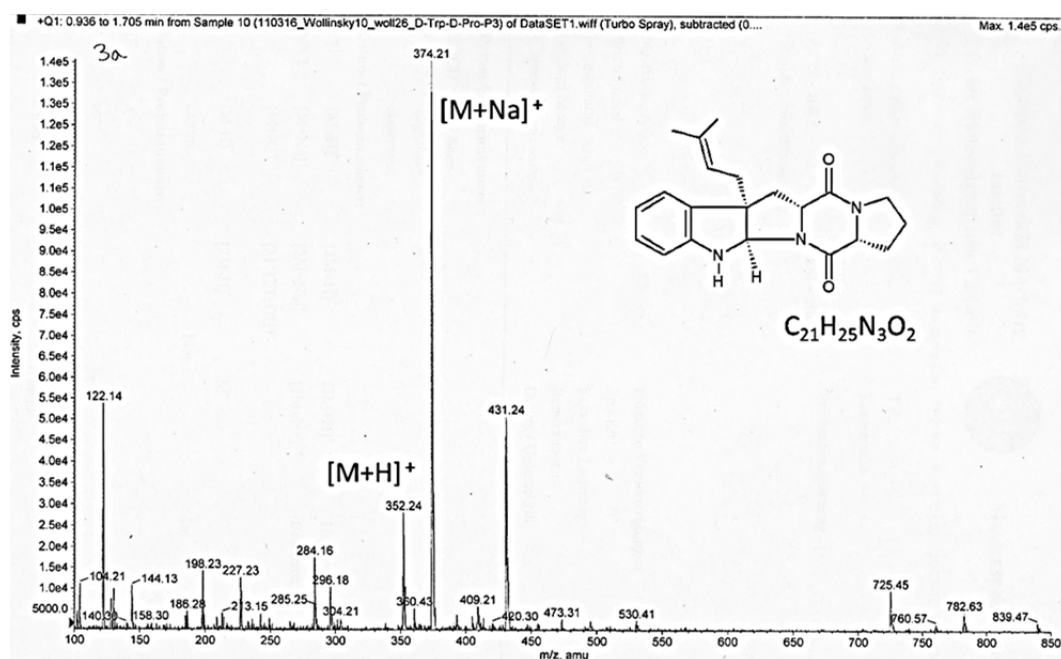
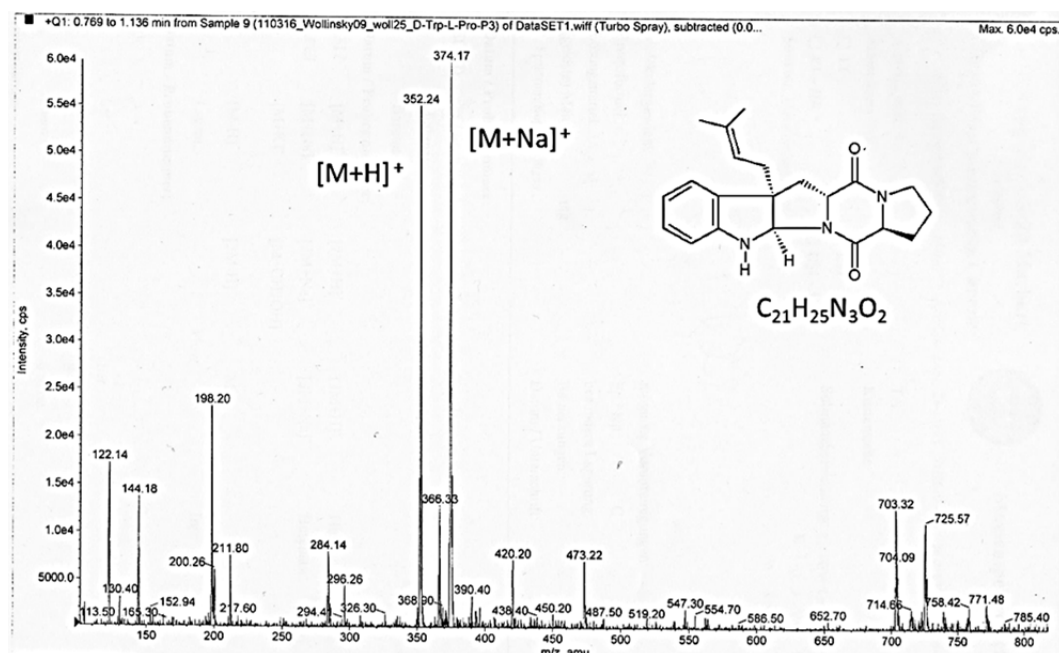
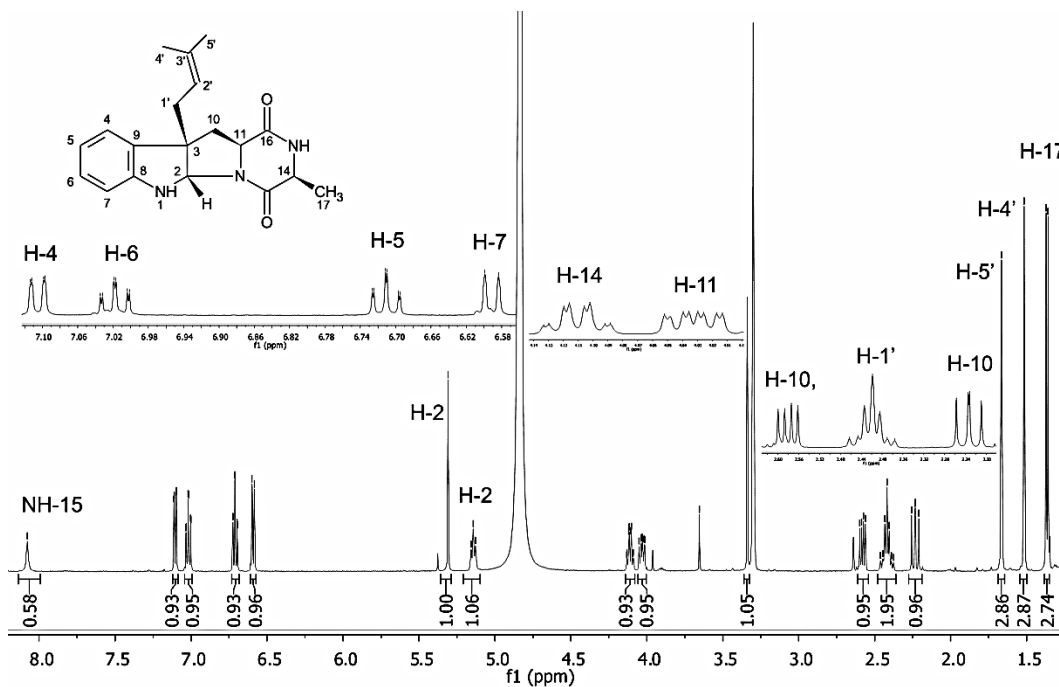


Abbildung 6-35: ESI-MS-Spektrum von *cyclo*-C3 α -dimethylallyl-D-Trp-D-Pro (3c)

6.3.2. *cyclo*-C3 α -dimethylallyl-D-Trp-L-Pro (4c)Abbildung 6-36: ESI-MS-Spektrum von *cyclo*-C3 α -dimethylallyl-D-Trp-L-Pro (4c)6.3.3. *cyclo*-C3 β -dimethylallyl-L-Trp-L-Ala (5c)Abbildung 6-37: 1H -NMR-Spektrum von *cyclo*-C3 β -dimethylallyl-L-Trp-L-Ala (5c) in CD_3OH (600 MHz)

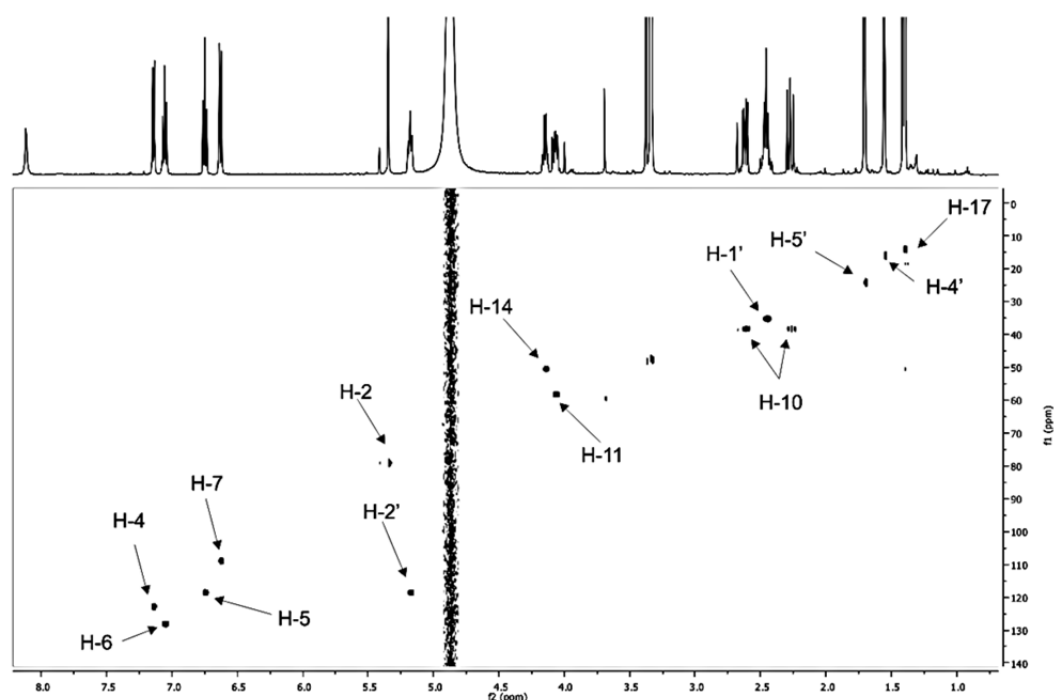


Abbildung 6-38: HSQC-Spektrum von *cyclo*-C3β-dimethylallyl-L-Trp-L-Ala (5c) in CD₃OH (600 MHz)

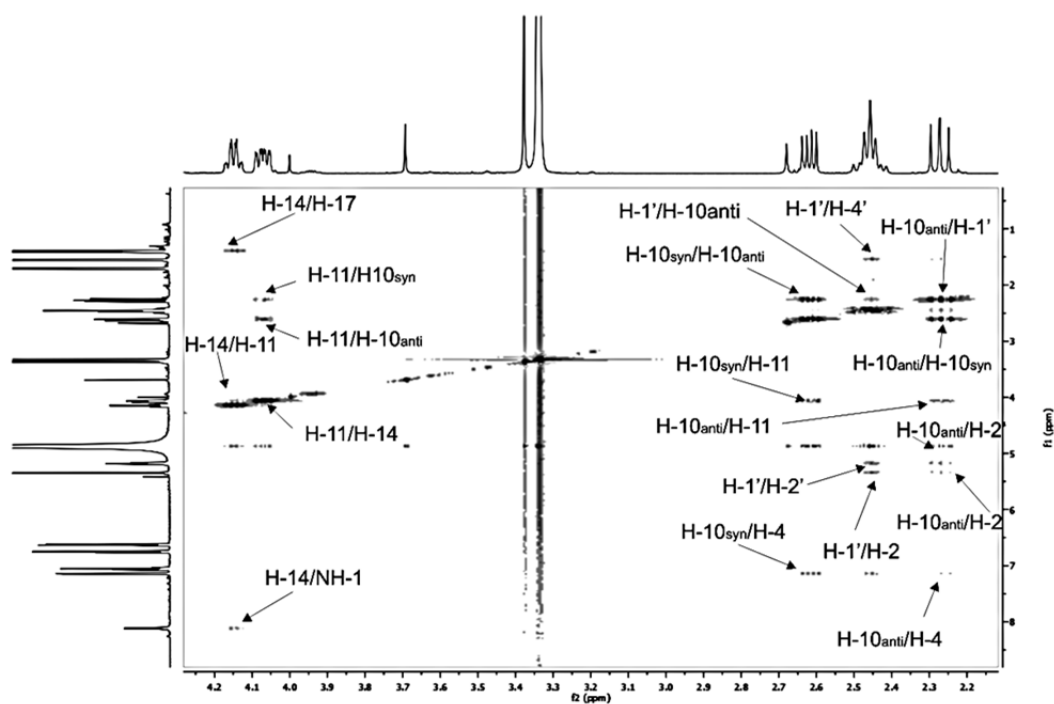
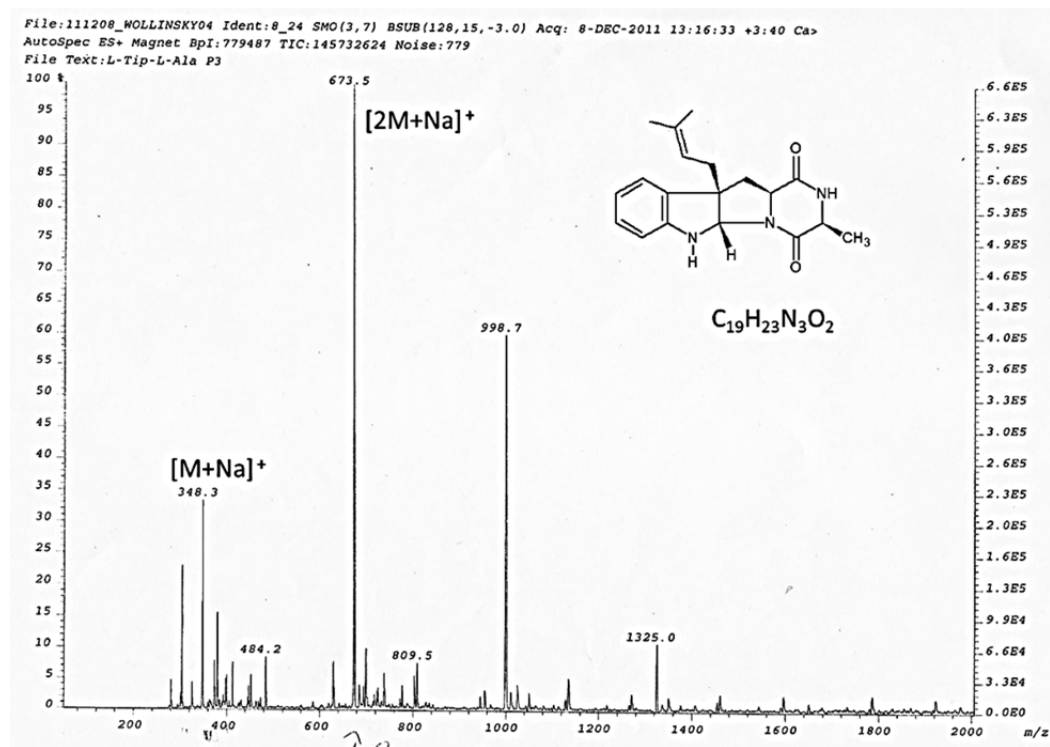
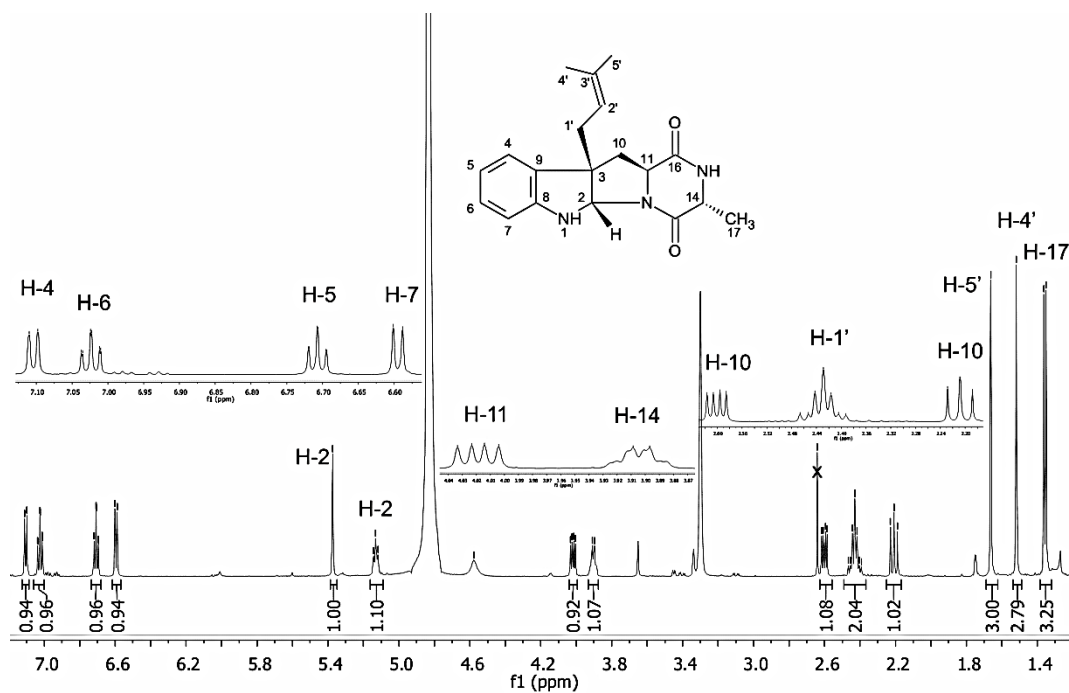


Abbildung 6-39: NOESY-Spektrum von *cyclo*-C3β-dimethylallyl-L-Trp-L-Ala (5c) in CD₃OH (600 MHz)

Abbildung 6-40: ESI-MS-Spektrum von *cyclo*-C3β-dimethylallyl-L-Trp-L-Ala (5c)6.3.4. *cyclo*-C3β-dimethylallyl-L-Trp-D-Ala (6c)Abbildung 6-41: ^1H -NMR-Spektrum von *cyclo*-C3β-dimethylallyl-L-Trp-D-Ala (6c) in CD_3OH (600 MHz)

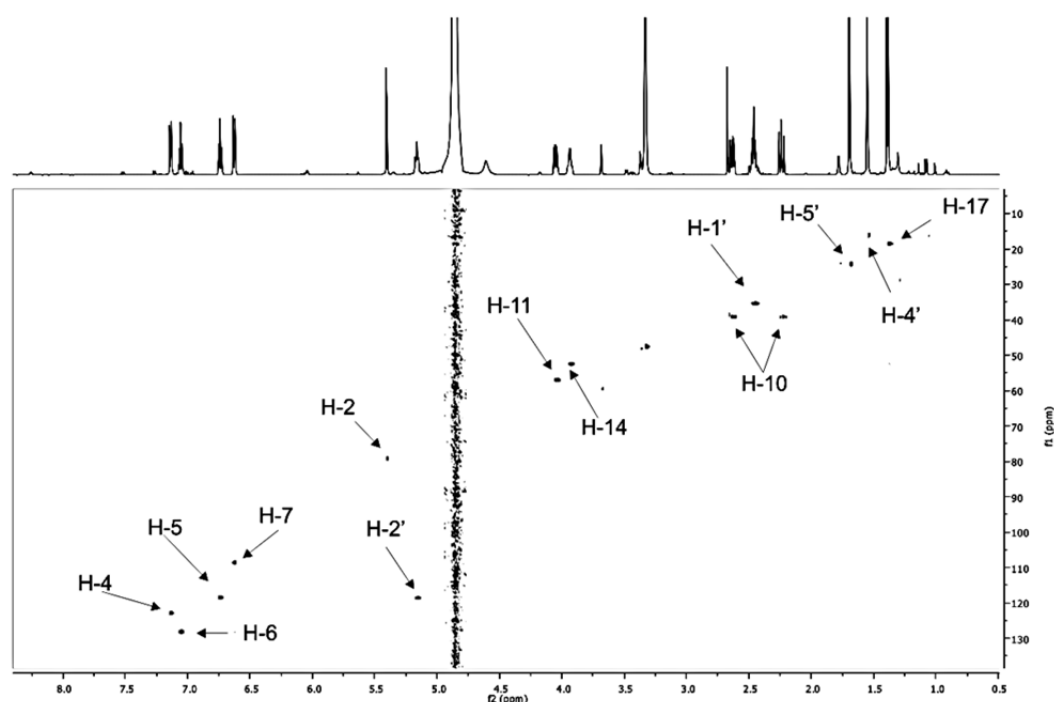


Abbildung 6-42: HSQC-Spektrum von *cyclo*-C3 β -dimethylallyl-L-Trp-D-Ala (6c) in CD₃OH (600 MHz)

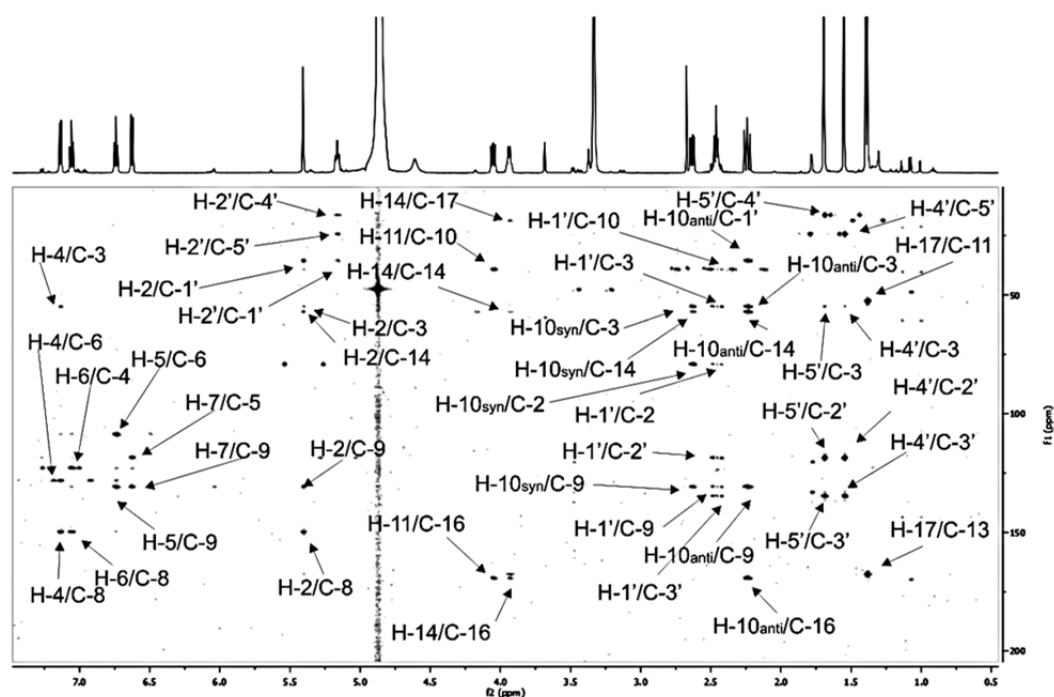
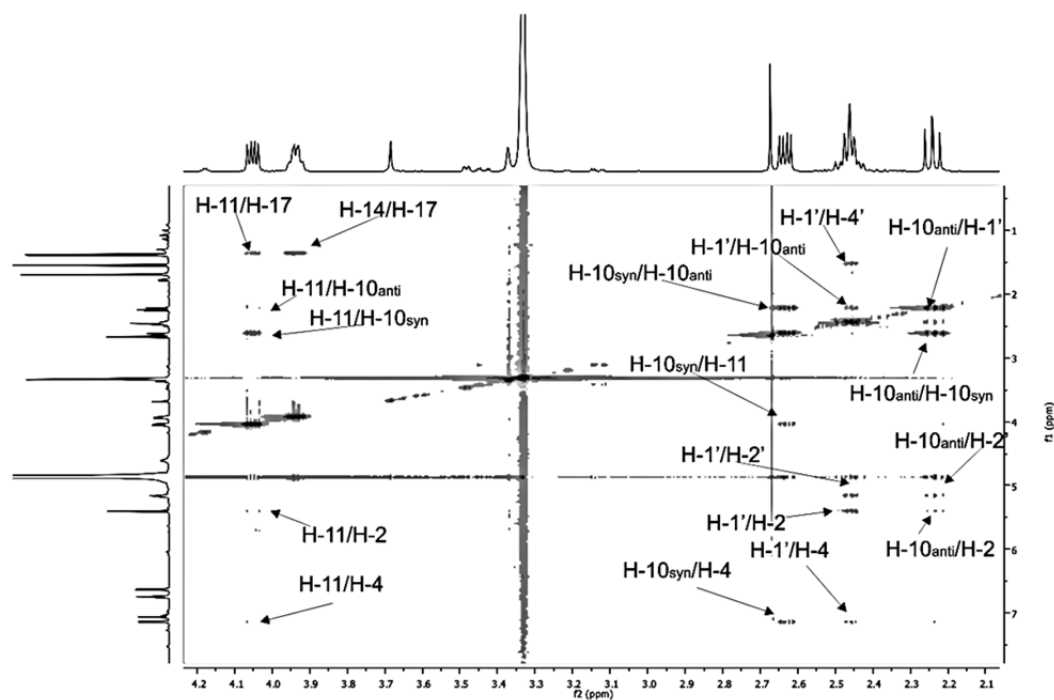
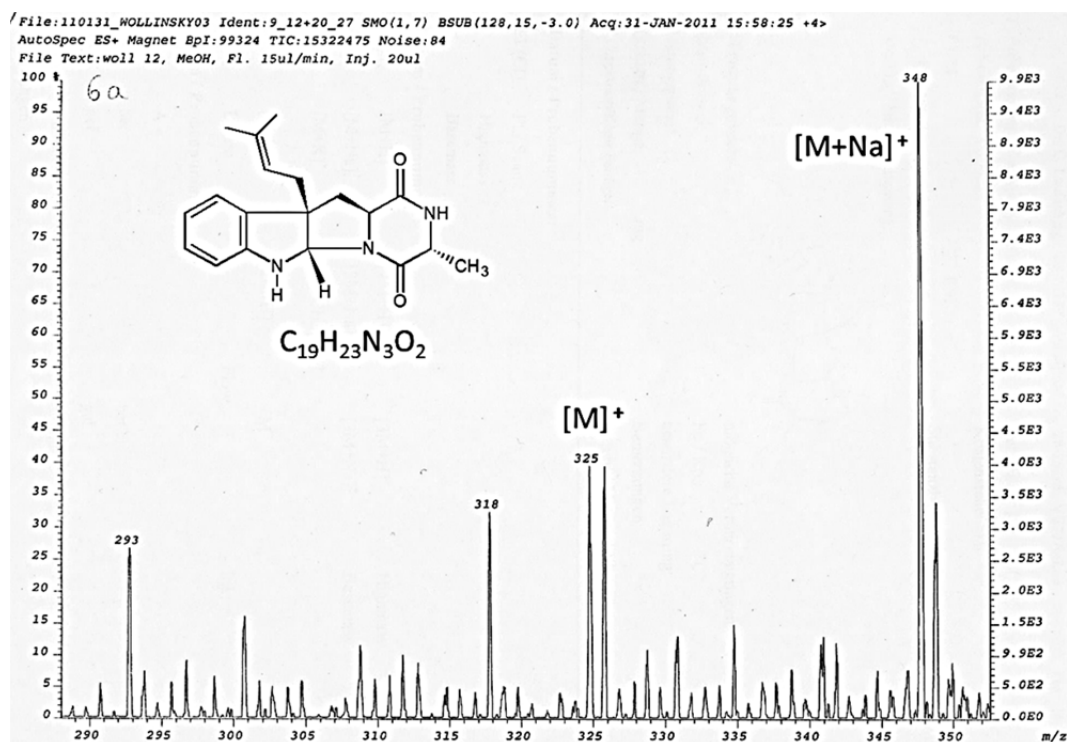
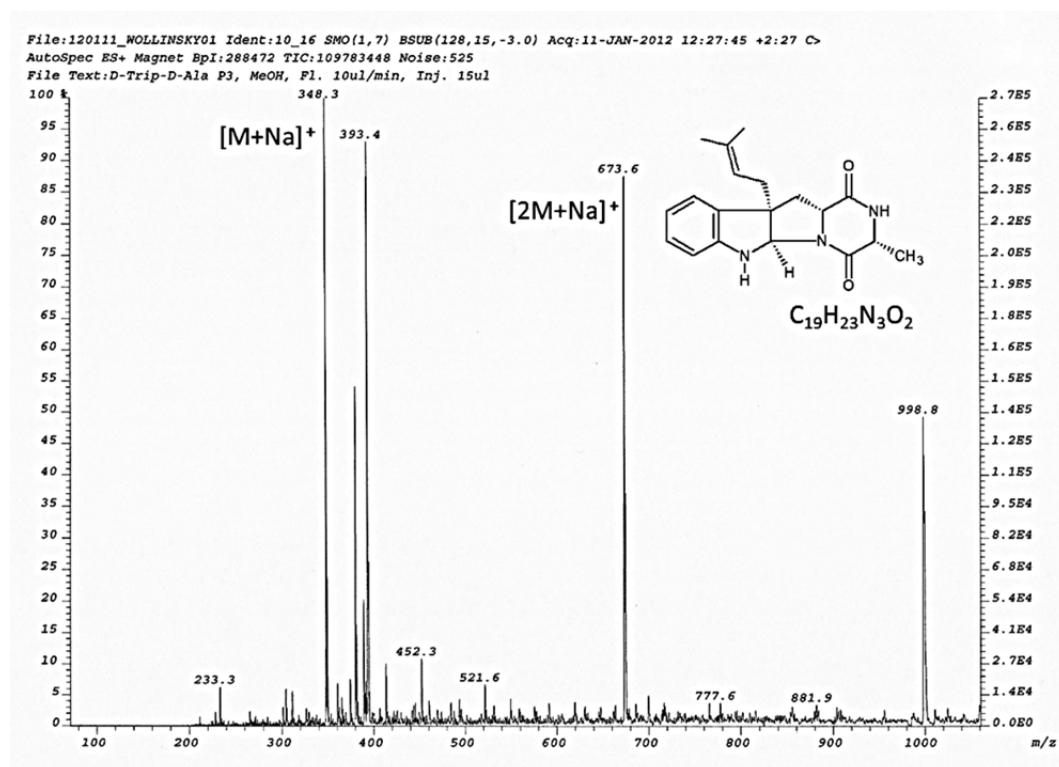
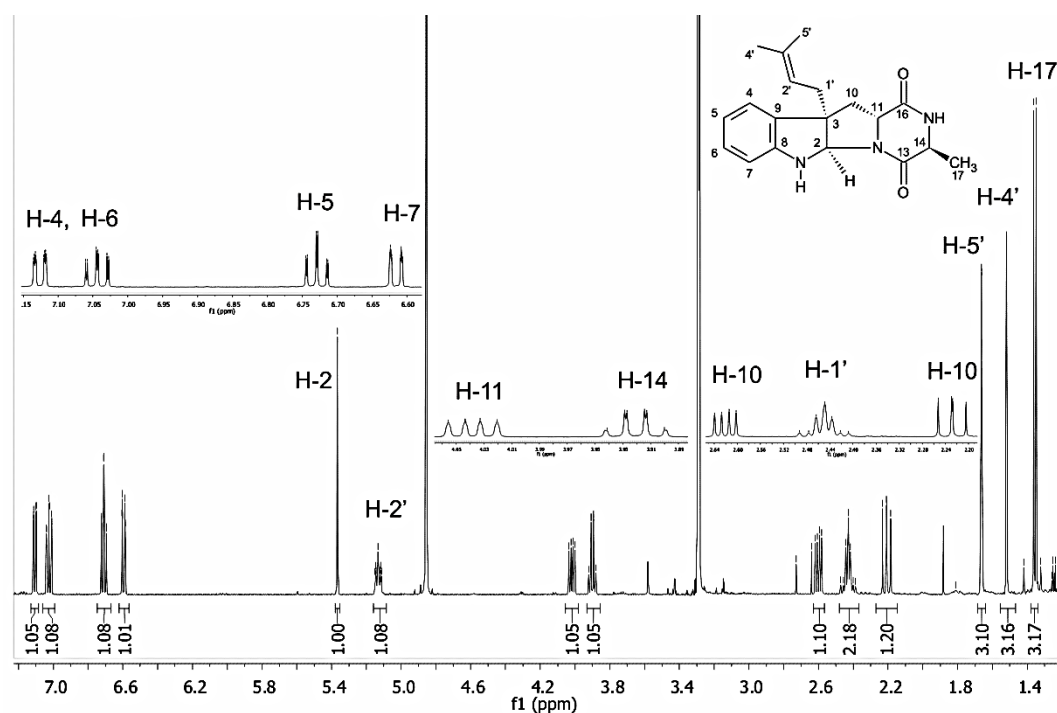
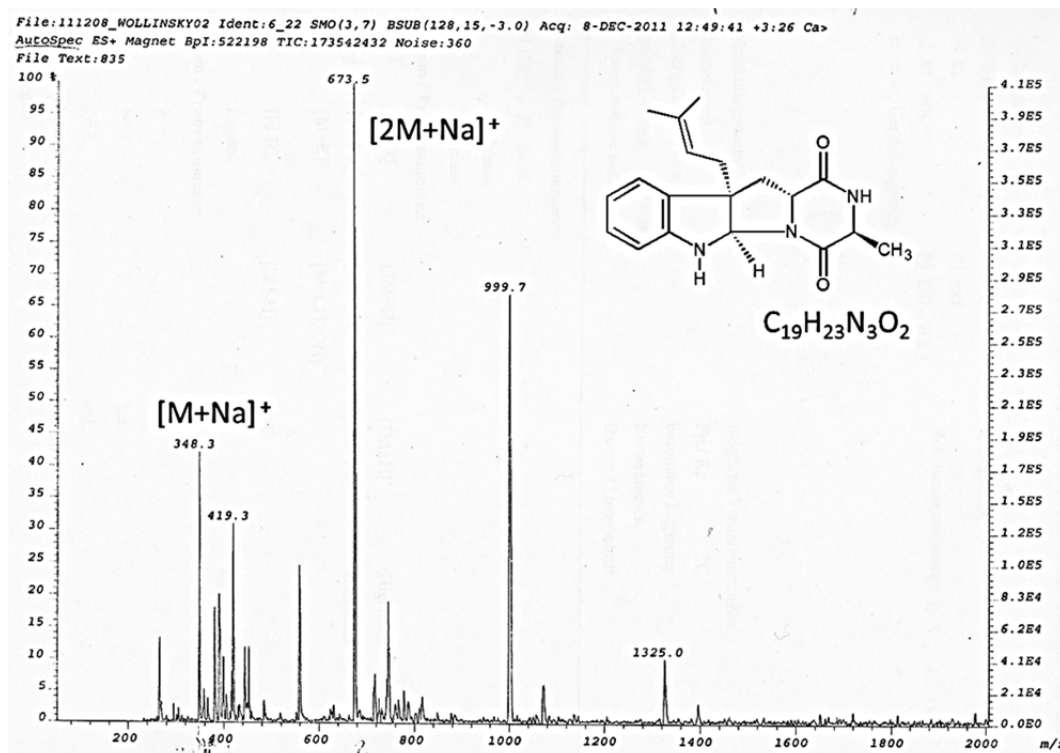
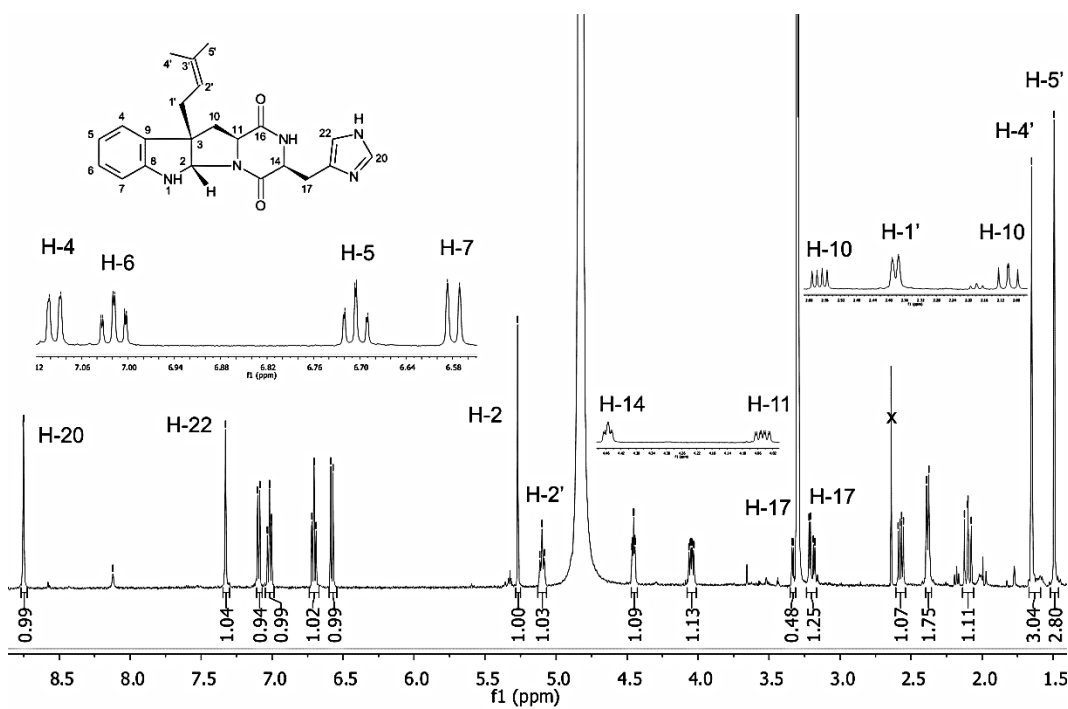


Abbildung 6-43: HMBC-Spektrum von *cyclo*-C3 β -dimethylallyl-L-Trp-D-Ala (6c) in CD₃OH (600 MHz)

Abbildung 6-44: NOESY-Spektrum von *cyclo*-C3β-dimethylallyl-L-Trp-D-Ala (6c) in CD₃OH (600 MHz)Abbildung 6-45: ESI-MS-Spektrum von *cyclo*-C3β-dimethylallyl-L-Trp-D-Ala (6c)

6.3.5. *cyclo*-C3 α -dimethylallyl-D-Trp-D-Ala (7c)Abbildung 6-46: ESI-MS-Spektrum von *cyclo*-C3 α -dimethylallyl-D-Trp-D-Ala (7c)6.3.6. *cyclo*-C3 α -dimethylallyl-D-Trp-L-Ala (8c)Abbildung 6-47: ^1H -NMR-Spektrum von *cyclo*-C3 α -dimethylallyl-D-Trp-L-Ala (8c) CD_3OD (500 MHz)

Abbildung 6-48: ESI-MS-Spektrum von *cyclo*-C3 α -dimethylallyl-D-Trp-L-Ala (8c)6.3.7. *cyclo*-C3 β -dimethylallyl-L-Trp-L-His (9c)Abbildung 6-49: ^1H -NMR-Spektrum von *cyclo*-C3 β -dimethylallyl-L-Trp-L-His (9c) in CD_3OH (600 MHz)

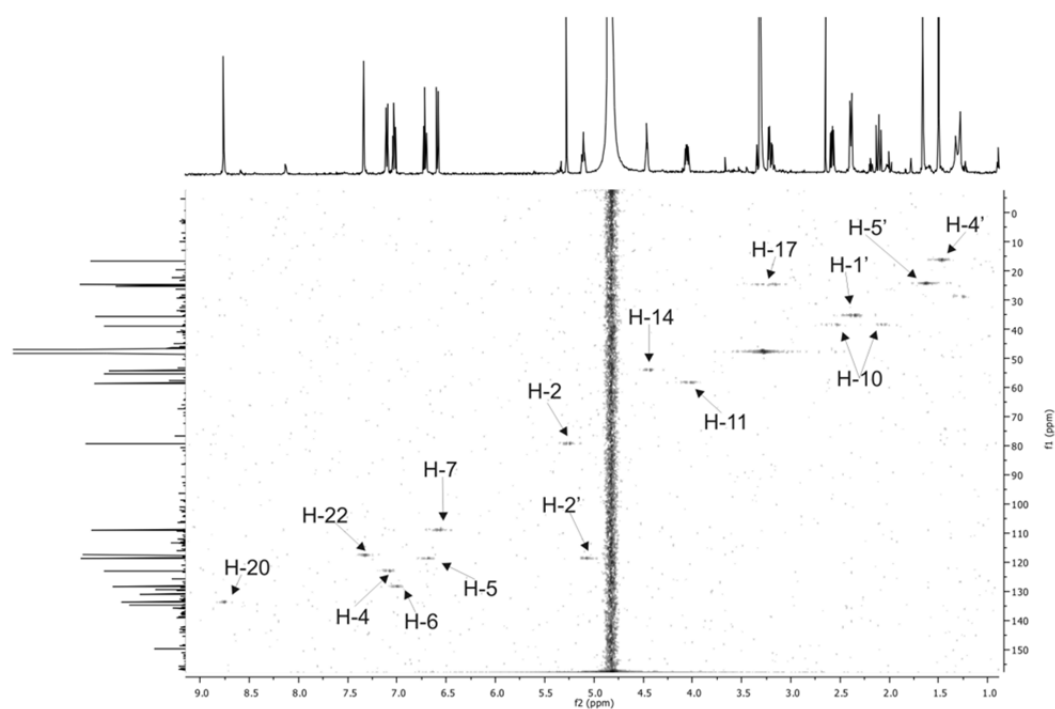


Abbildung 6-50: HSQC-Spektrum von *cyclo*-C3 β -dimethylallyl-L-Trp-L-His (9c) in CD₃OH (600 MHz)

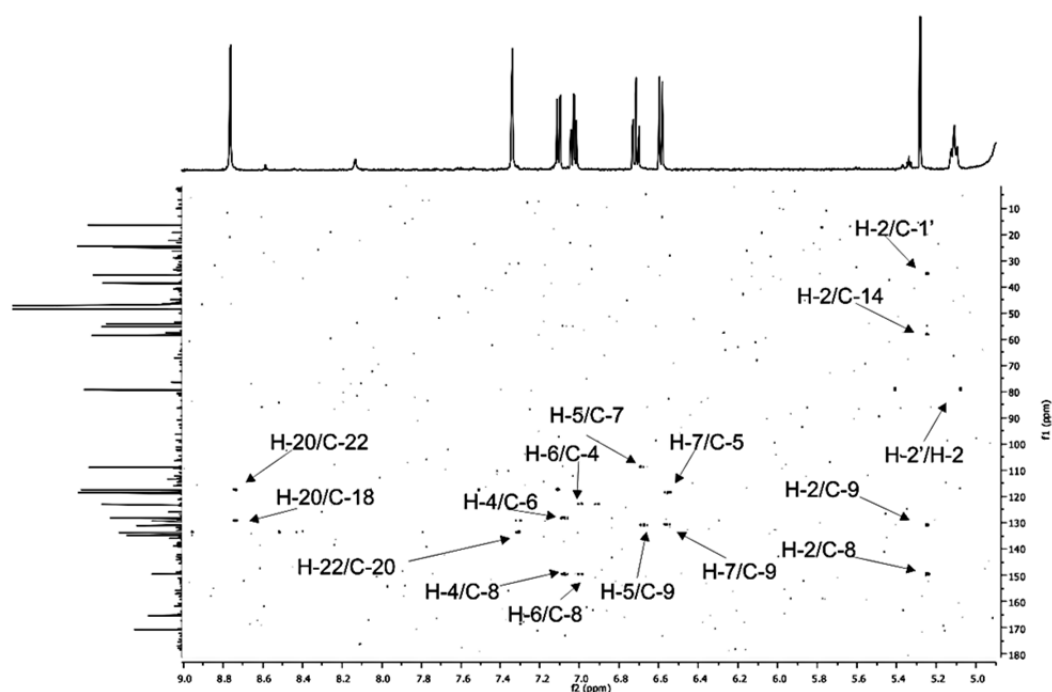


Abbildung 6-51: : HMBC-Spektrum des Tieffeldes von *cyclo*-C3 β -dimethylallyl-L-Trp-L-His (9c) in CD₃OH (600 MHz)

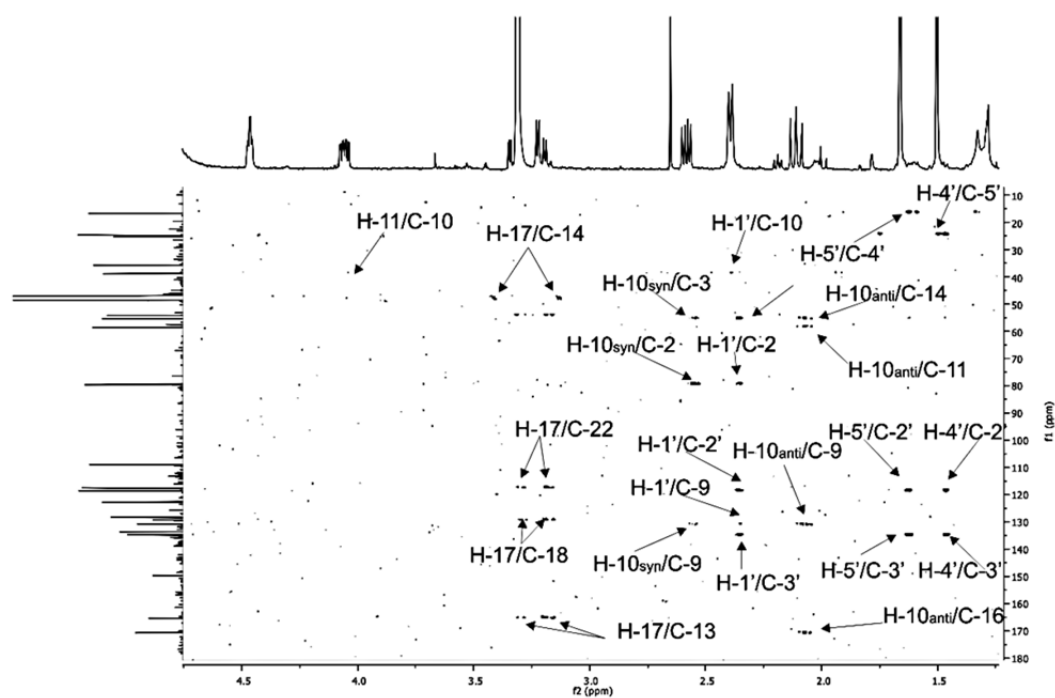


Abbildung 6-52: HMBC-Spektrum des Hochfeldes von *cyclo*-C3 β -dimethylallyl-L-Trp-L-His (9c) in CD₃OH (600 MHz)

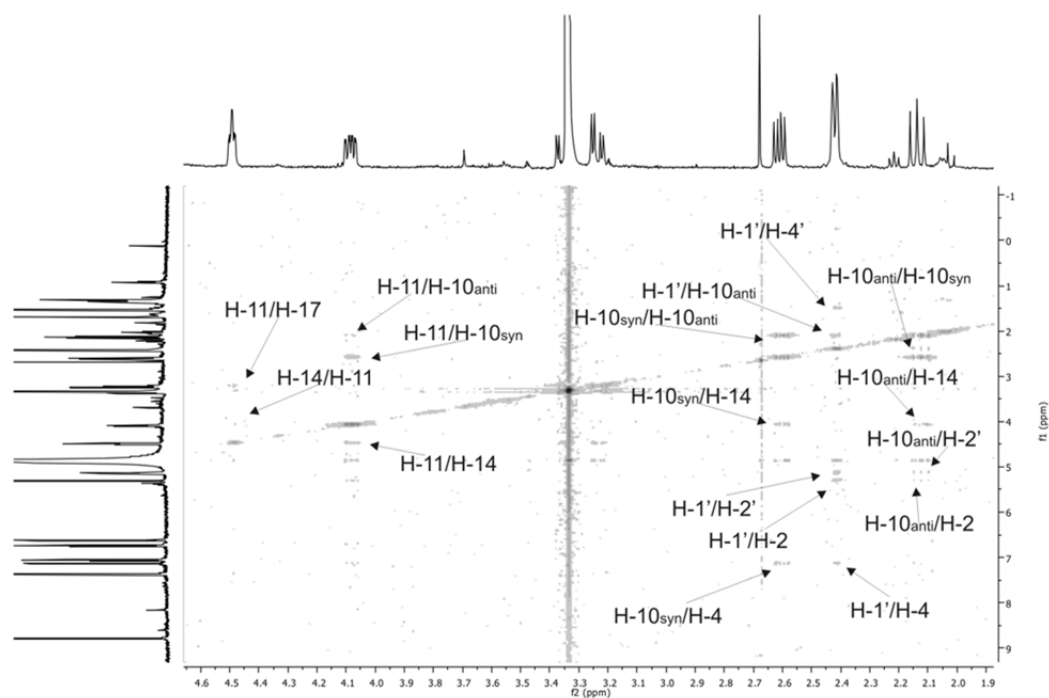
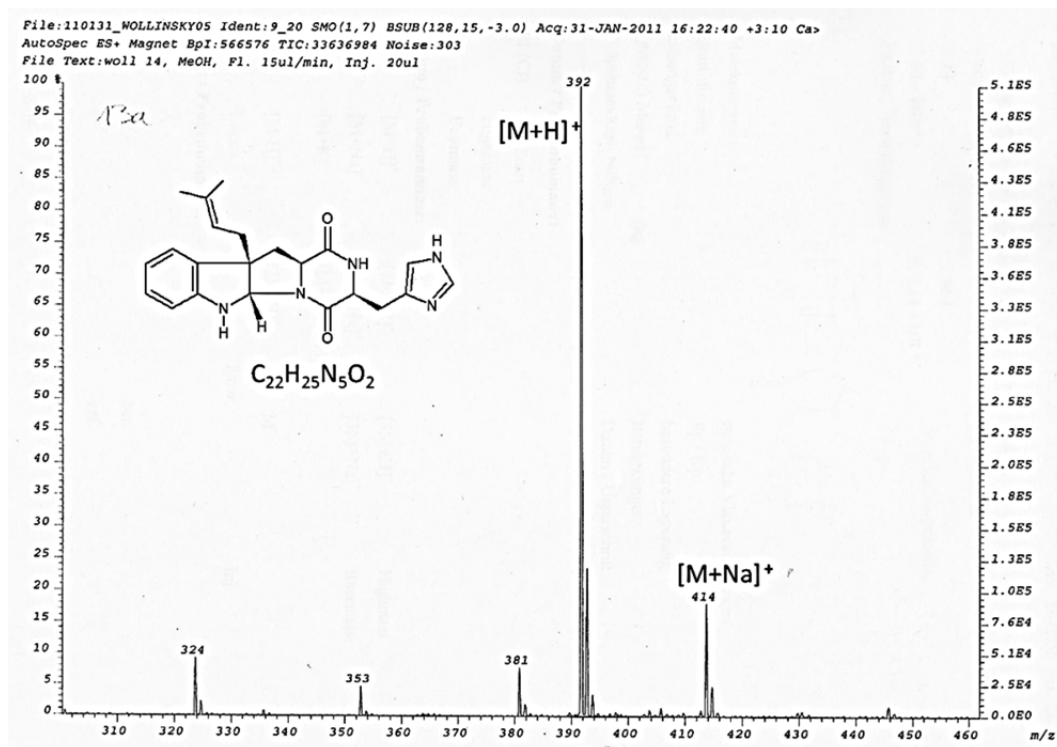
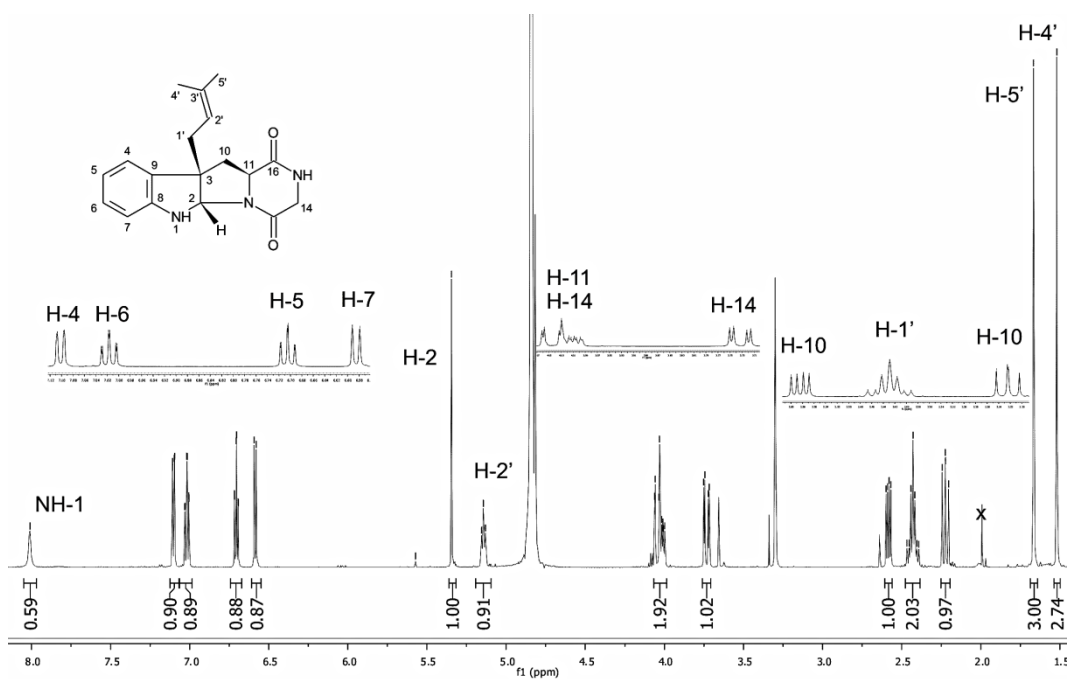


Abbildung 6-53: NOESY-Spektrum von *cyclo*-C3 β -dimethylallyl-L-Trp-L-His (9c) in CD₃OH (600 MHz)

Abbildung 6-54: ESI-MS-Spektrum von *cyclo*-C3β-dimethylallyl-L-Trp-L-His (9c)6.3.8. *cyclo*-C3β-dimethylallyl-L-Trp-Gly (10c)Abbildung 6-55: ^1H -NMR-Spektrum von *cyclo*-C3β-dimethylallyl-L-Trp-Gly (10c) in CD_3OH (600 MHz)

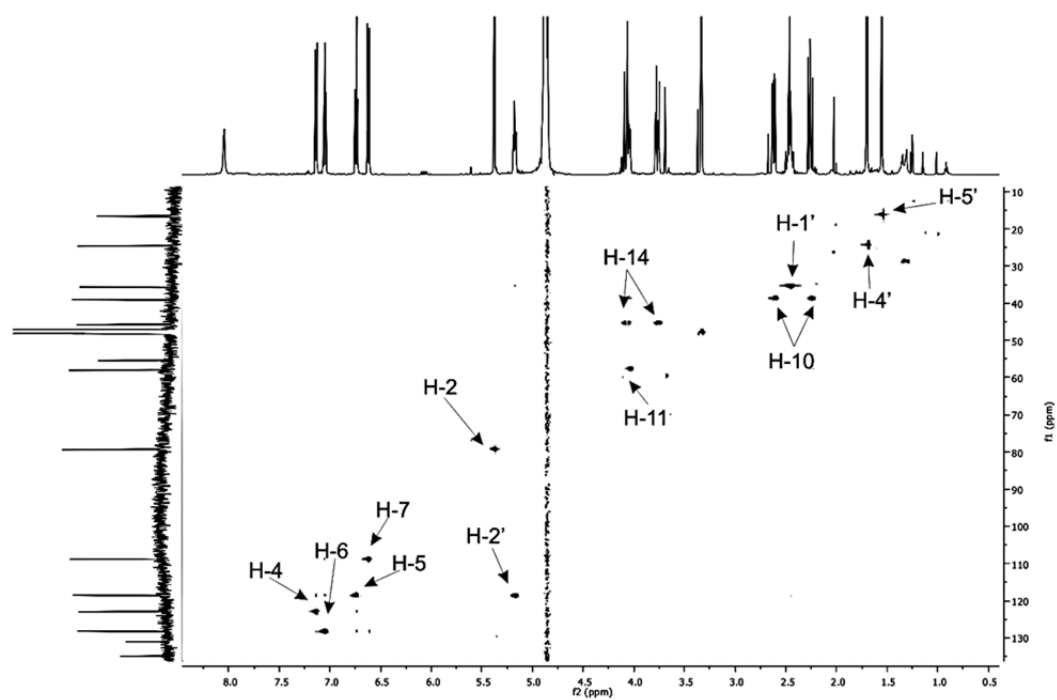


Abbildung 6-56: HSQC-Spektrum von *cyclo*-C3β-dimethylallyl-L-Trp-Gly (10c) in CD₃OH (600 MHz)

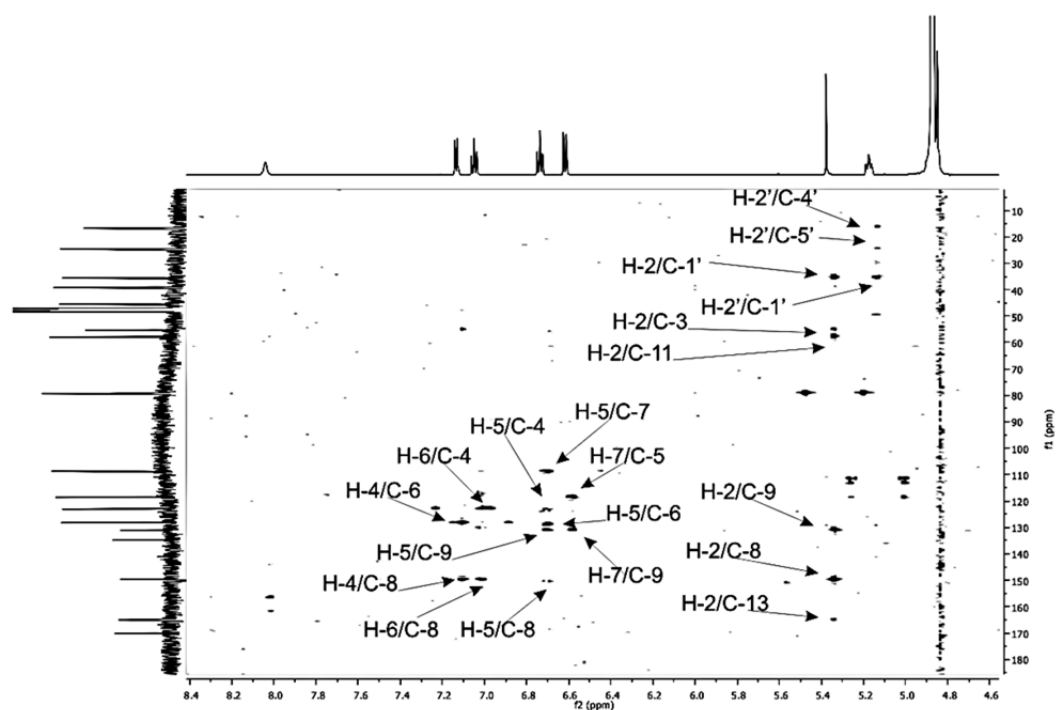


Abbildung 6-57: HMBC-Spektrum des Tieffeldes von *cyclo*-C3β-dimethylallyl-L-Trp-Gly (10c) in CD₃OH (600 MHz)

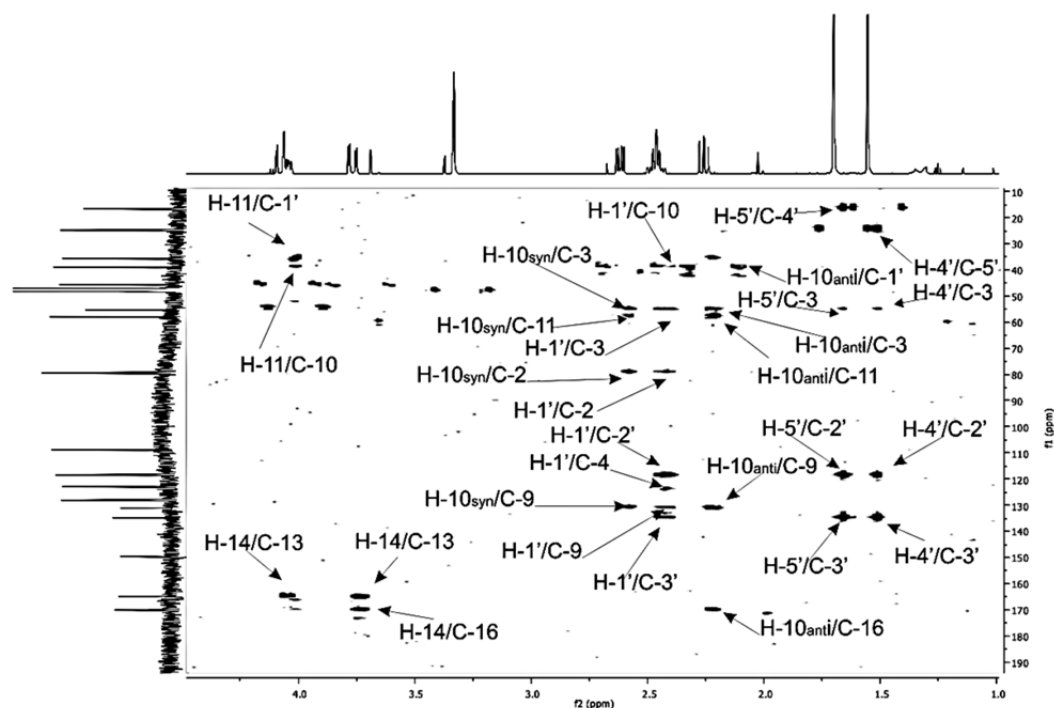


Abbildung 6-58: HMBC-Spektrum des Hochfeldes von *cyclo*-C3β-dimethylallyl-L-Trp-Gly (10c) in CD₃OH (600 MHz)

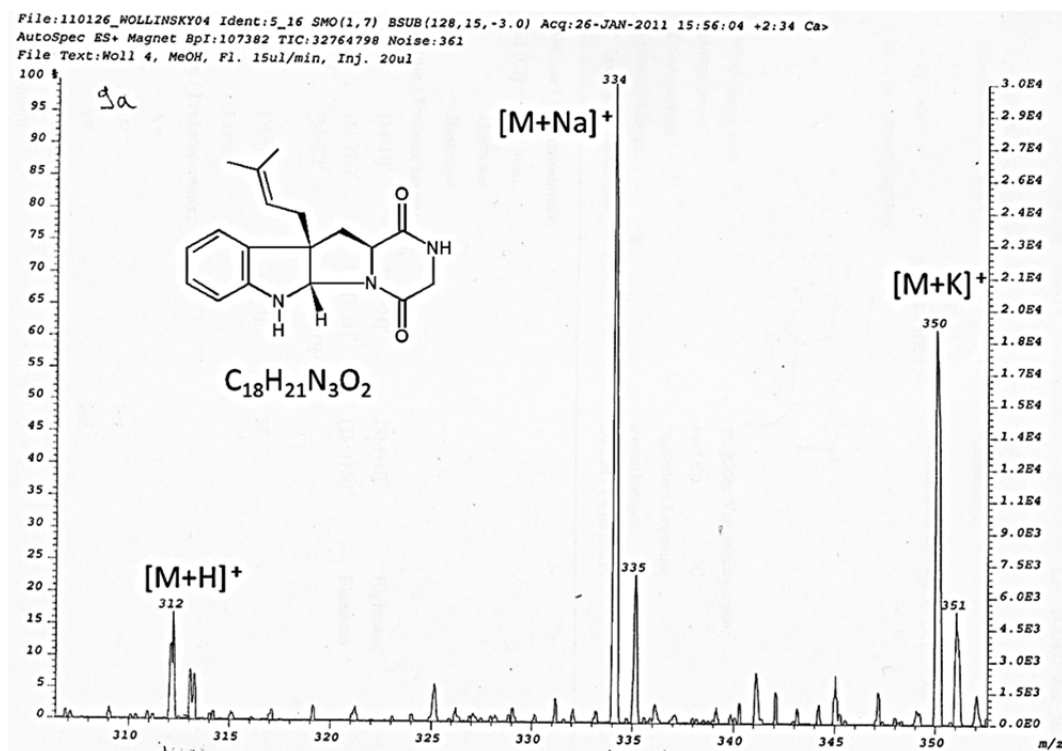
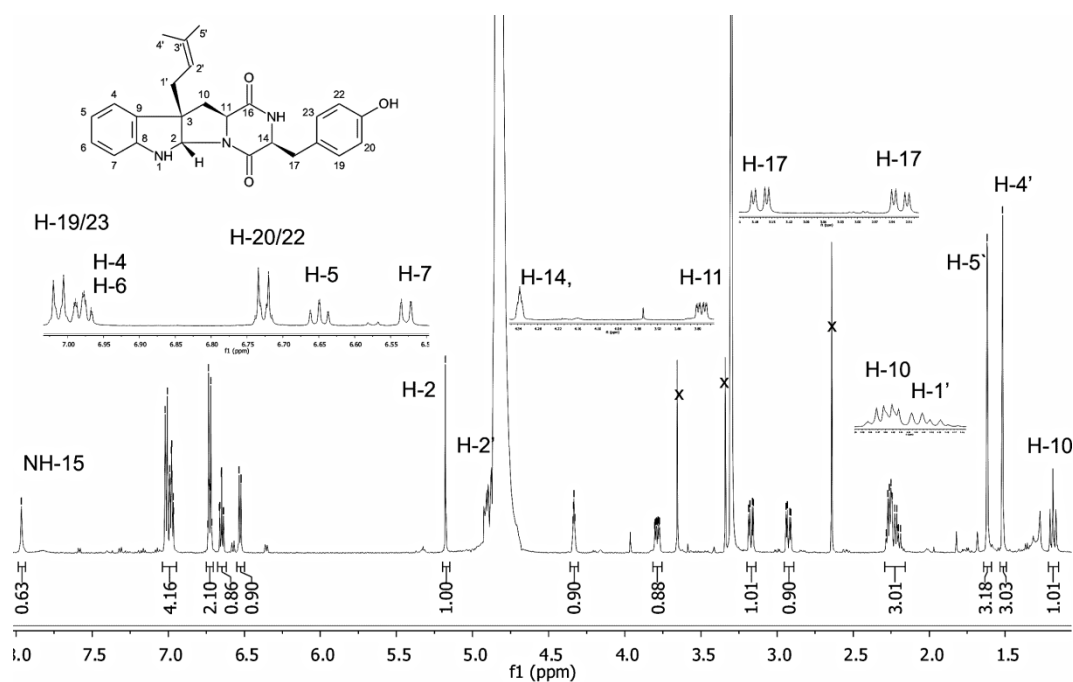
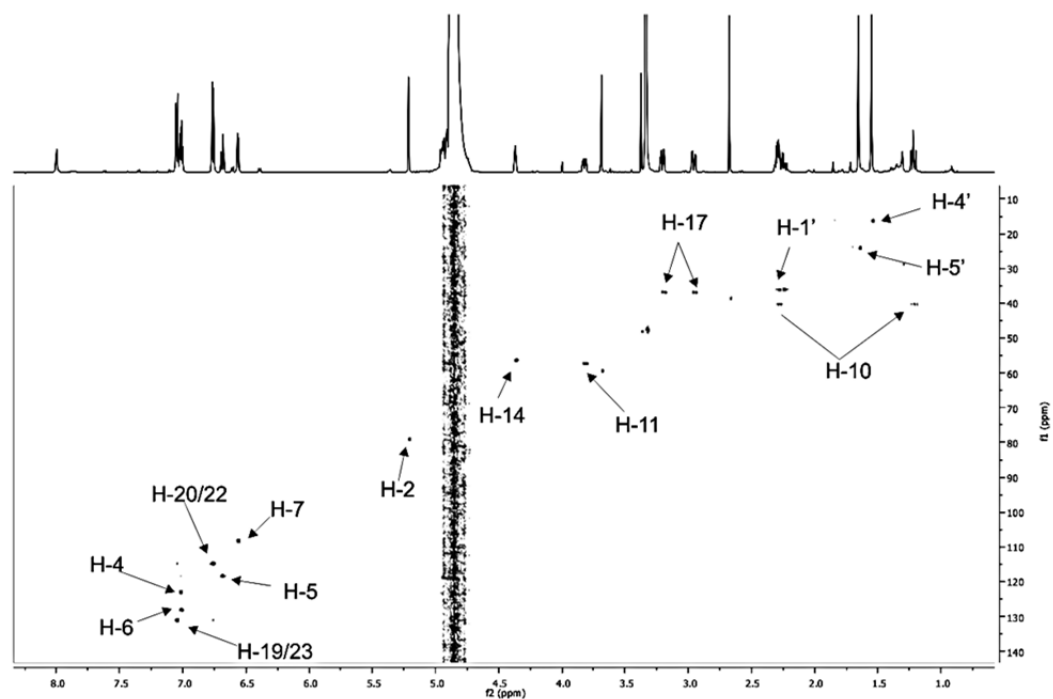


Abbildung 6-59: ESI-MS-Spektrum von *cyclo*-C3β-dimethylallyl-L-Trp-Gly (10c)

6.3.9. *cyclo*-C3 β -dimethylallyl-L-Trp-L-Tyr (13c)Abbildung 6-60: ^1H -NMR-Spektrum von *cyclo*-C3 β -dimethylallyl-L-Trp-L-Tyr (13c) in CD_3OH (600 MHz)Abbildung 6-61: HSQC-Spektrum von *cyclo*-C3 β -dimethylallyl-L-Trp-L-Tyr (13c) in CD_3OH (600 MHz)

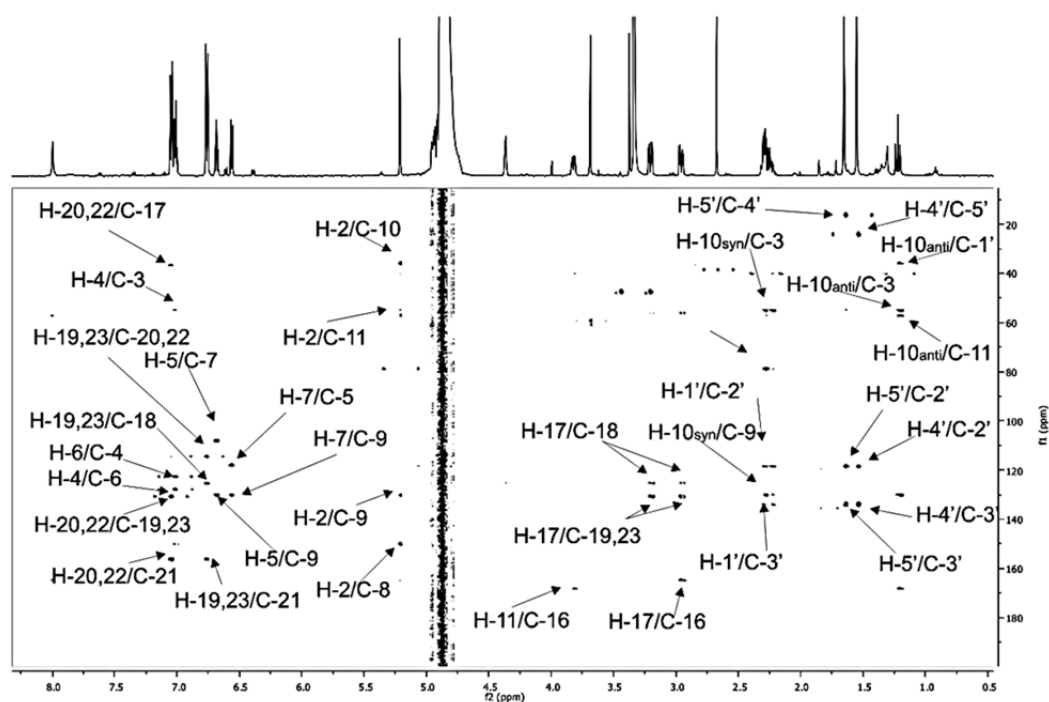


Abbildung 6-62: HMBC-Spektrum von *cyclo*-C3 β -dimethylallyl-L-Trp-L-Tyr (13c) in CD₃OH (600 MHz)

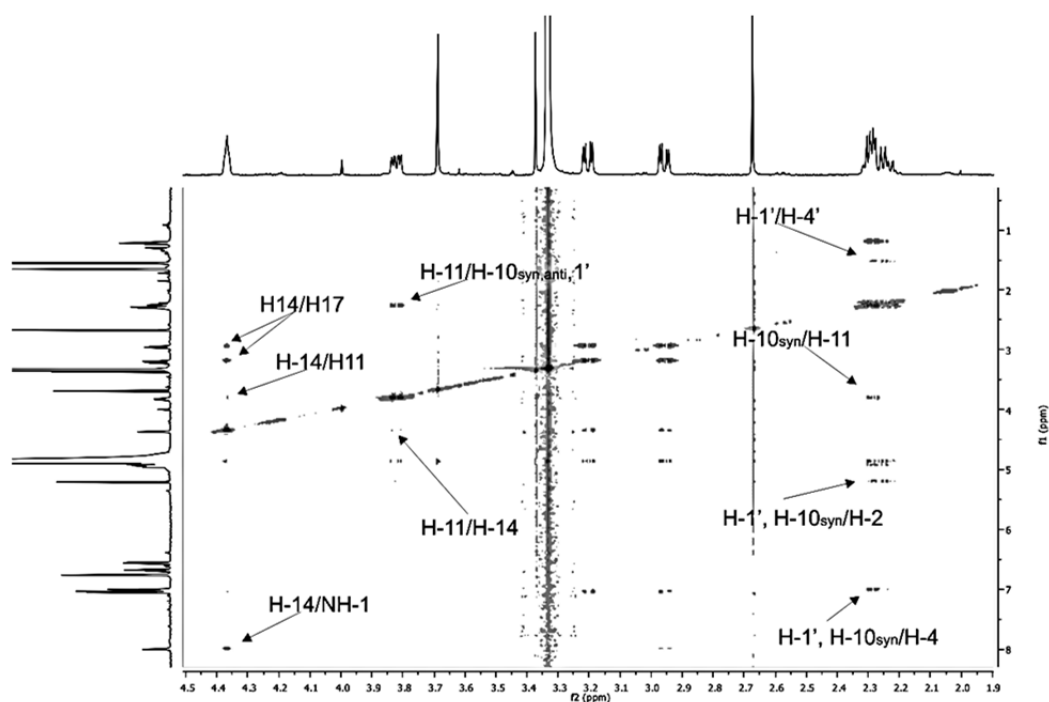
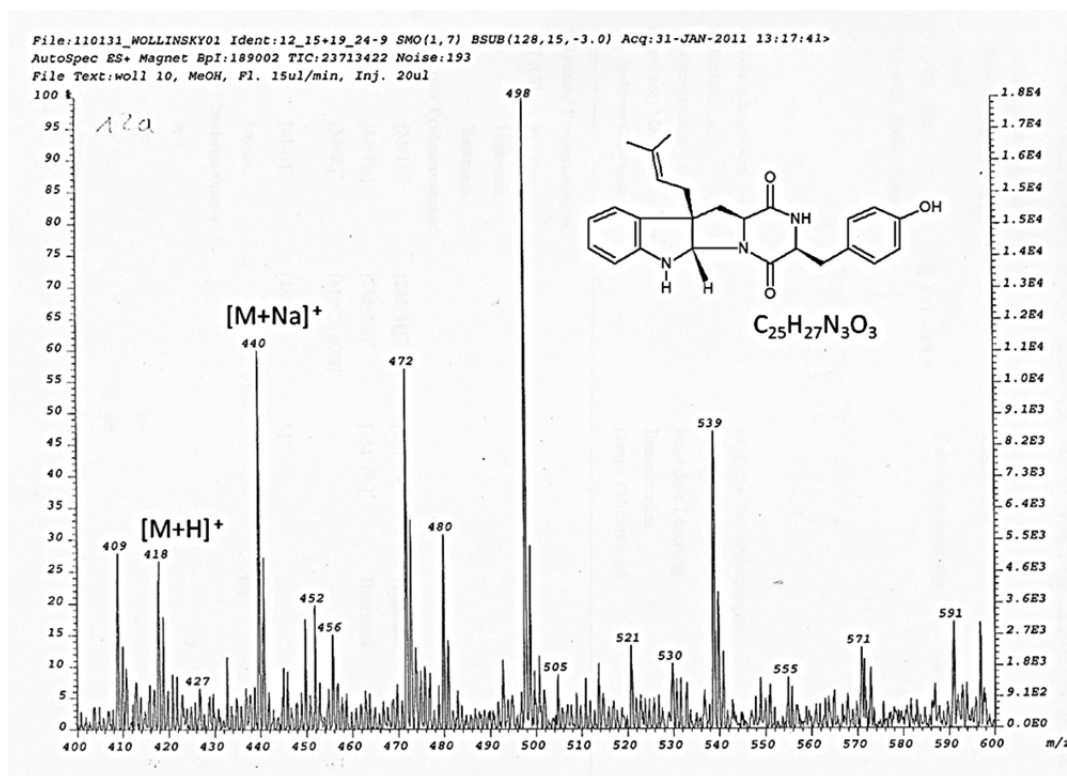
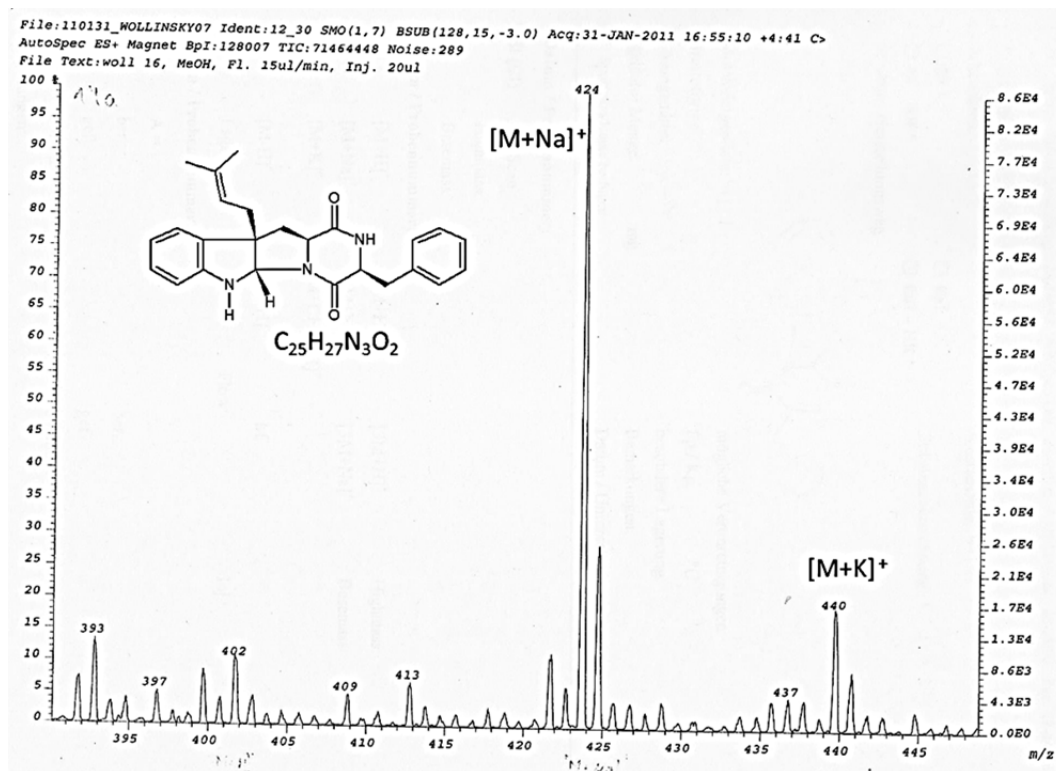


Abbildung 6-63: NOESY-Spektrum von *cyclo*-C3 β -dimethylallyl-L-Trp-L-Tyr (13c) in CD₃OH (600 MHz)

Abbildung 6-64: ESI-MS-Spektrum von *cyclo*-C3β-dimethylallyl-L-Trp-L-Tyr (13c)6.3.10. *cyclo*-C3β-dimethylallyl-L-Trp-L-Phe (14c)Abbildung 6-65: ESI-MS-Spektrum von *cyclo*-C3β-dimethylallyl-L-Trp-L-Phe (14c)

6.4. NMR und ESI-MS-Spektren der regulär N1-prenylierten FtmPT1 Produkte (d-Reihe)

6.4.1. *cyclo*-N1-dimethylallyl-D-Trp-D-Pro (5d)

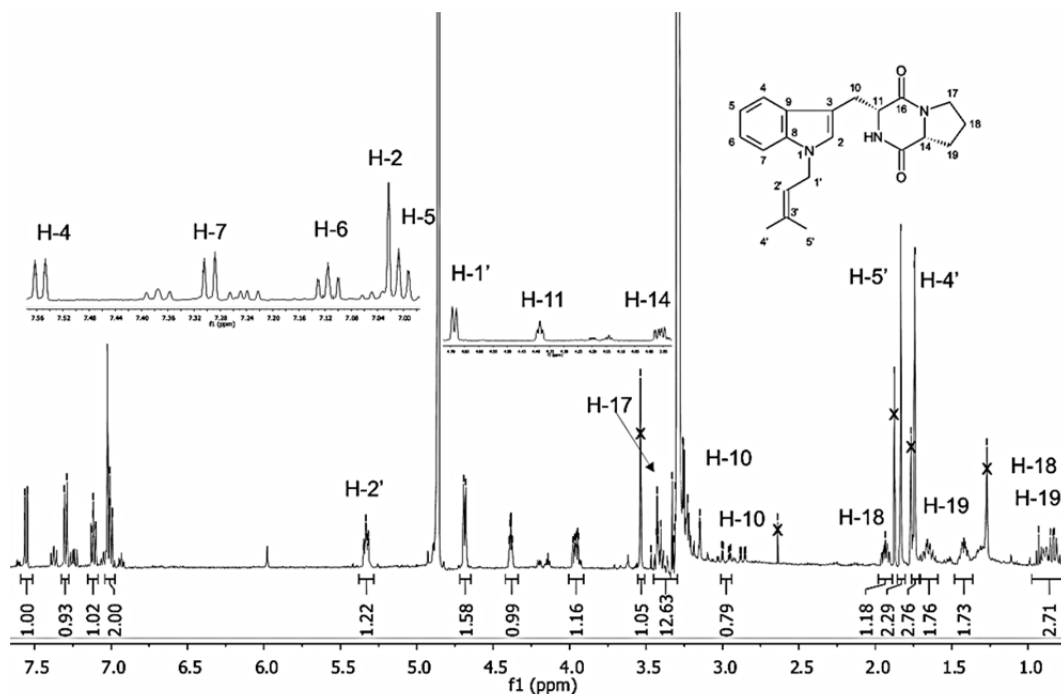


Abbildung 6-66: ¹H-NMR-Spektrum von *cyclo*-N1-dimethylallyl-D-Trp-D-Pro (5d) in CD₃OD (500 MHz)

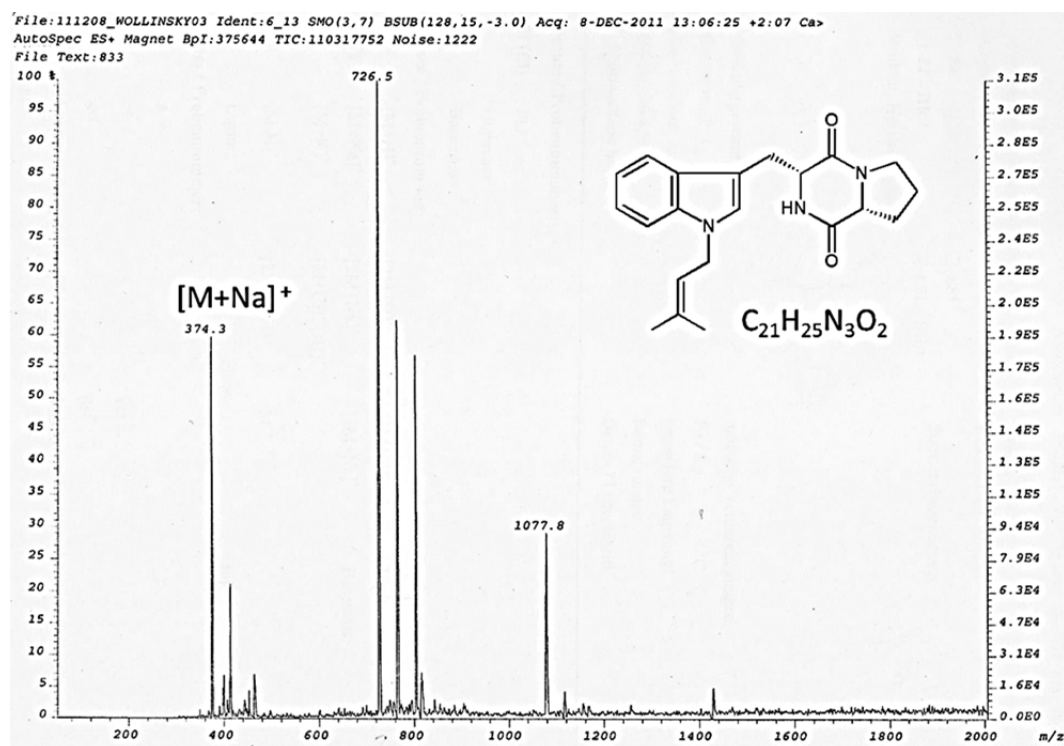
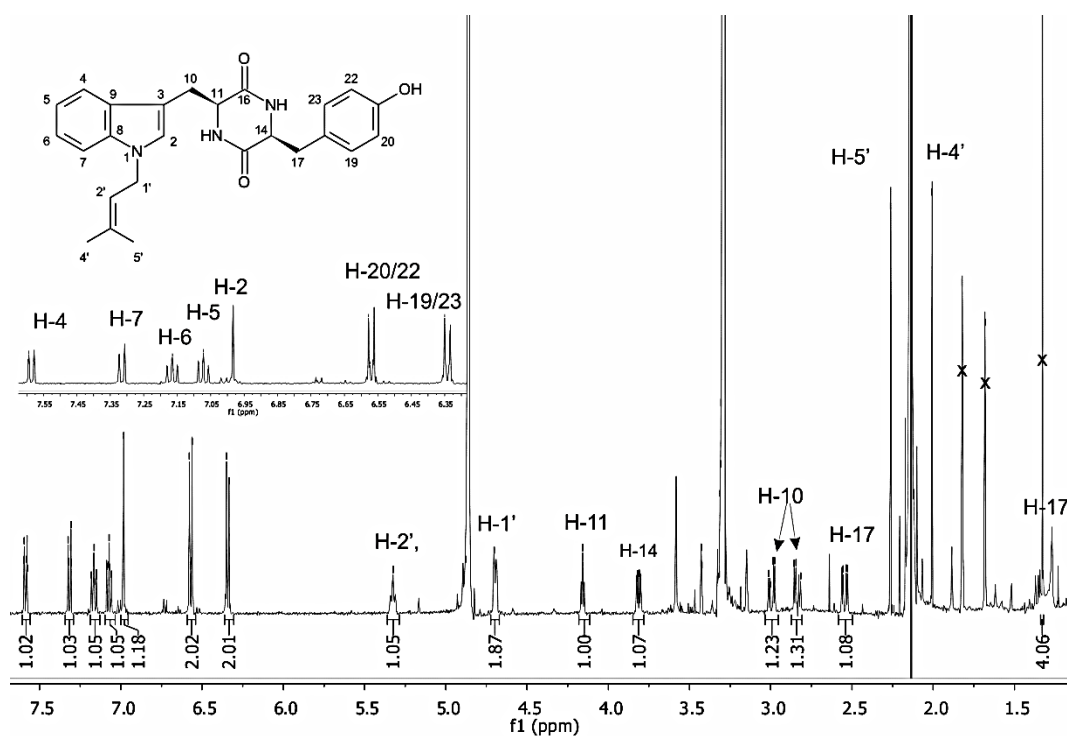
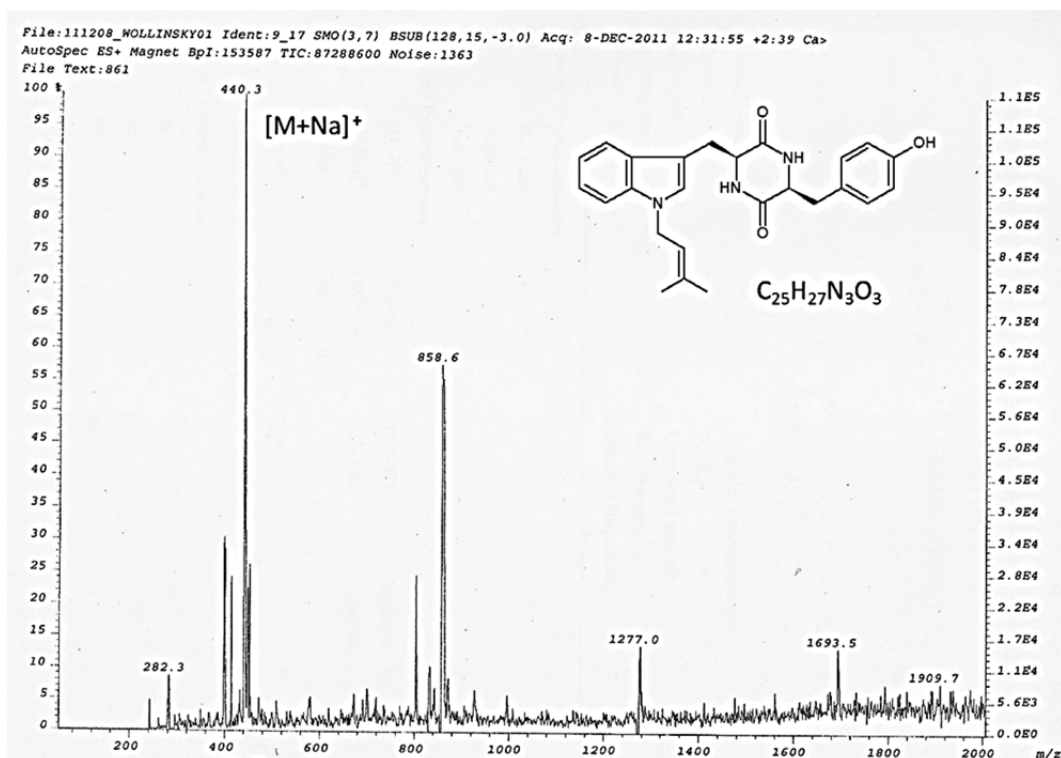


Abbildung 6-67: ESI-MS-Spektrum von *cyclo*-N1-dimethylallyl-D-Trp-D-Pro (5d)

6.4.2. *cyclo*-N1-dimethylallyl-L-Trp-L-Tyr (13d)Abbildung 6-68: ¹H-NMR-Spektrum von *cyclo*-N1-dimethylallyl-L-Trp-L-Tyr (13d) in CD₃OD (500 MHz)Abbildung 6-69: ESI-MS-Spektrum von *cyclo*-N1-dimethylallyl-L-Trp-L-Tyr (13d)

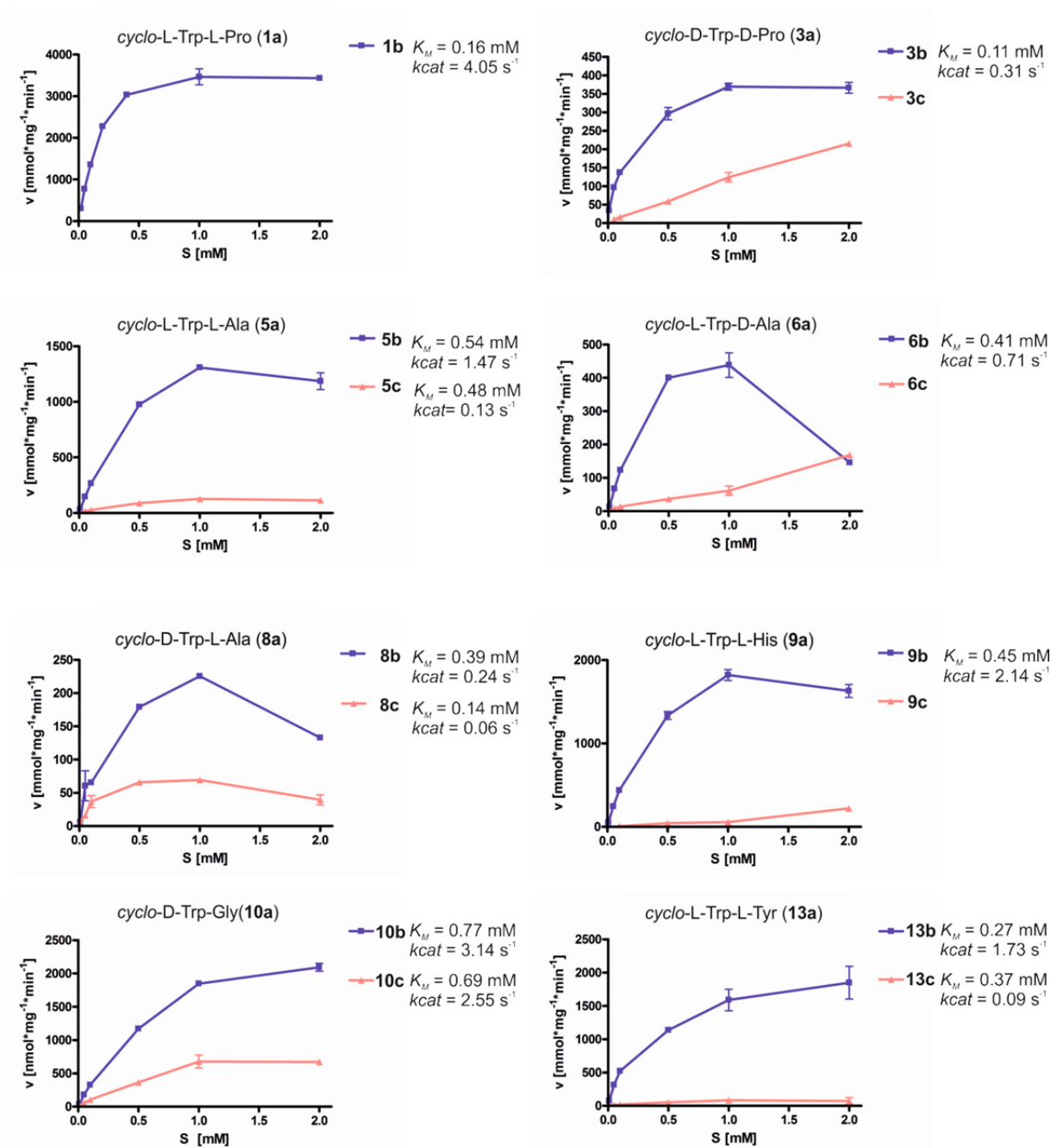
6.5. K_M -Werte

Abbildung 6-70: Abhängigkeit der Produktbildung zur b-, und c-Reihe bei verschiedenen Substratkonzentrationen von 1a, 3a, 5a, 6a, 8a, 9a, 10a und 13a

6.6. NMR-Spektren des aus *P. commune* NRRL2033 isolierten Fumigaclavin A

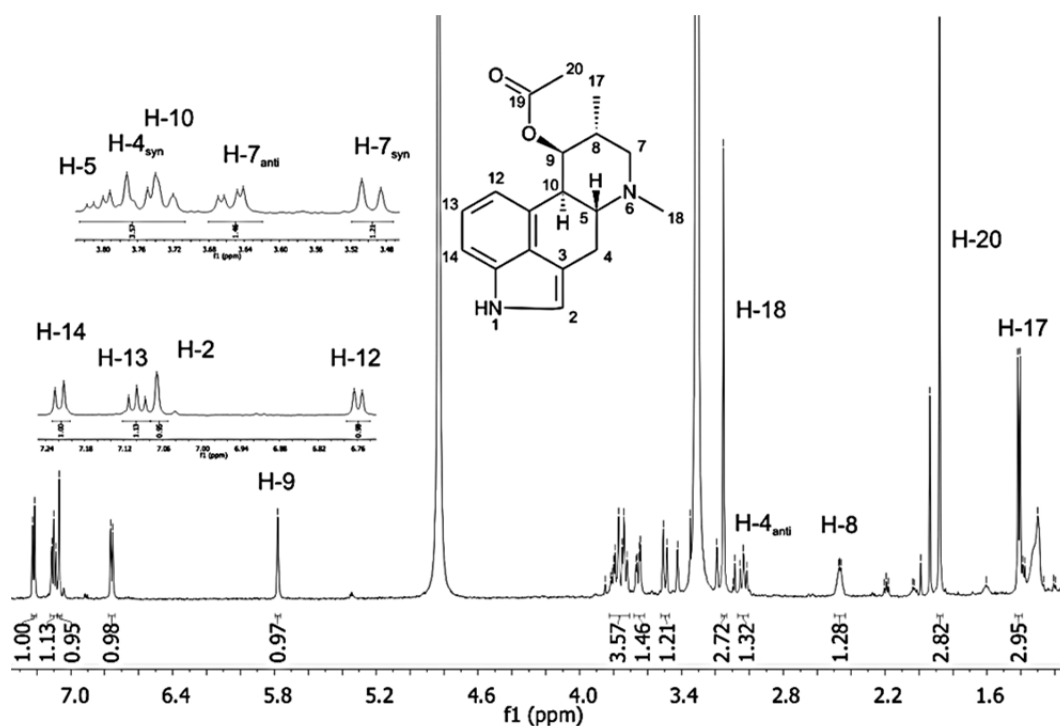


Abbildung 6-71: ^1H -NMR-Spektrum von Fumigaclavin A in CD_3OD (600 MHz)

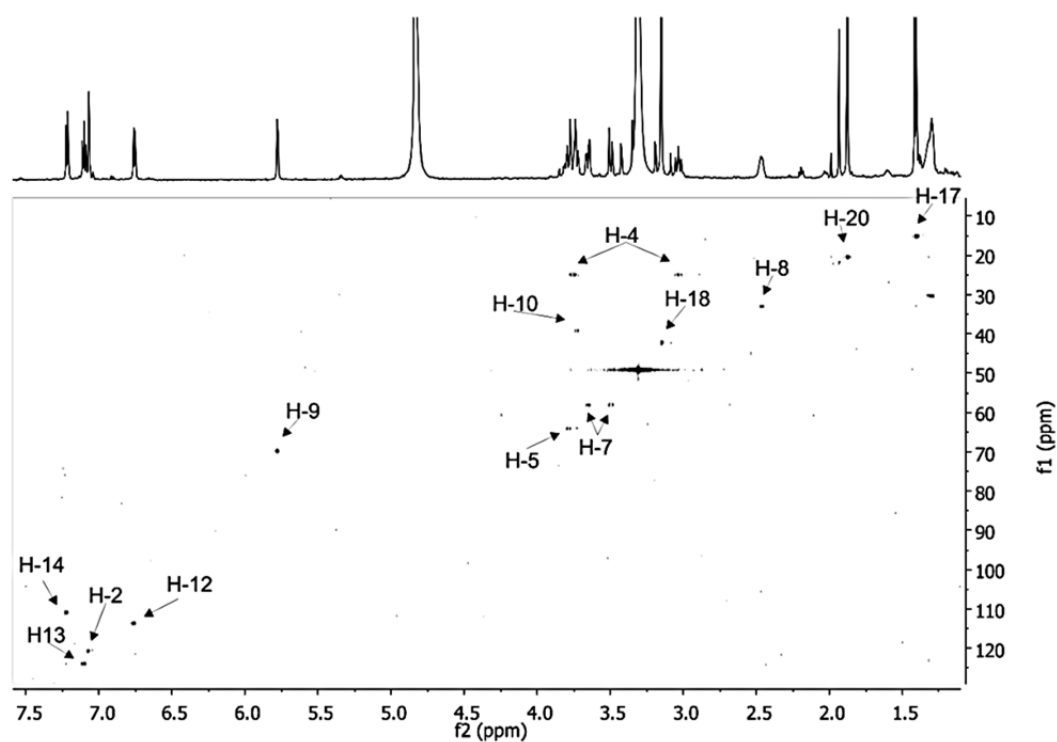
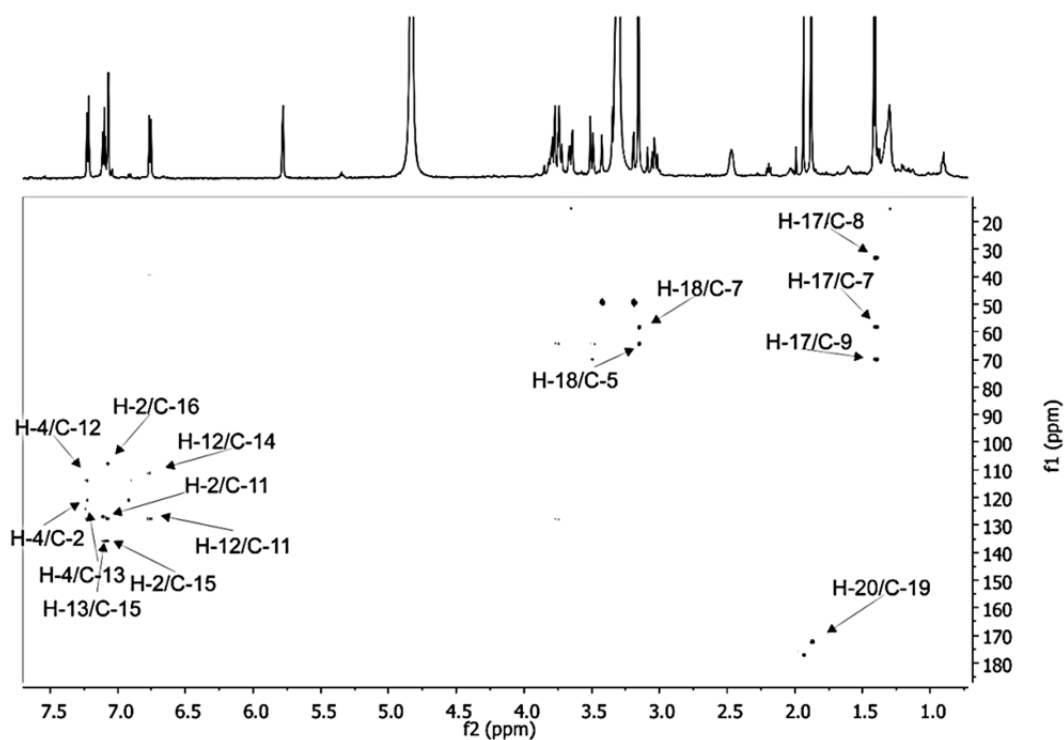
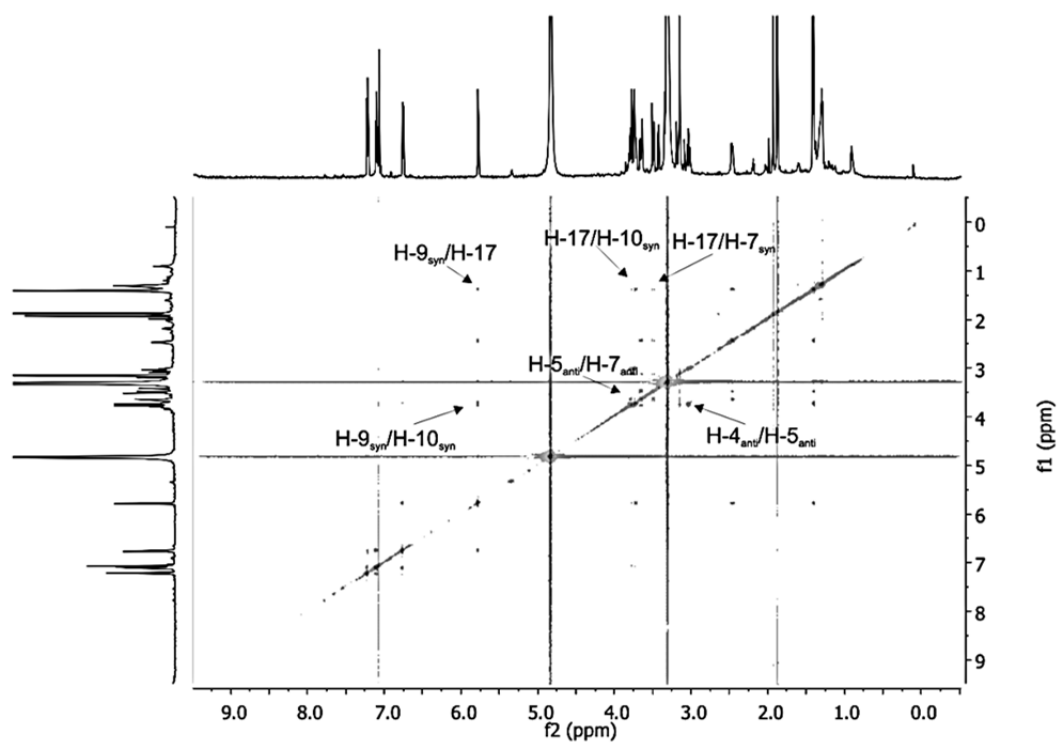


Abbildung 6-72: HSQC-Spektrum von Fumigaclavin A in CD_3OD (600 MHz)

Abbildung 6-73: HMBC-Spektrum von Fumigaclavin A in CD₃OD (600 MHz)Abbildung 6-74: NOESY-Spektrum von Fumigaclavin A in CD₃OD (600 MHz)

6.7. NMR und ESI-MS-Spektren der isolierten Naturstoffe aus *N. fischeri*

NRRL181

6.7.1. Fumitremorgin B

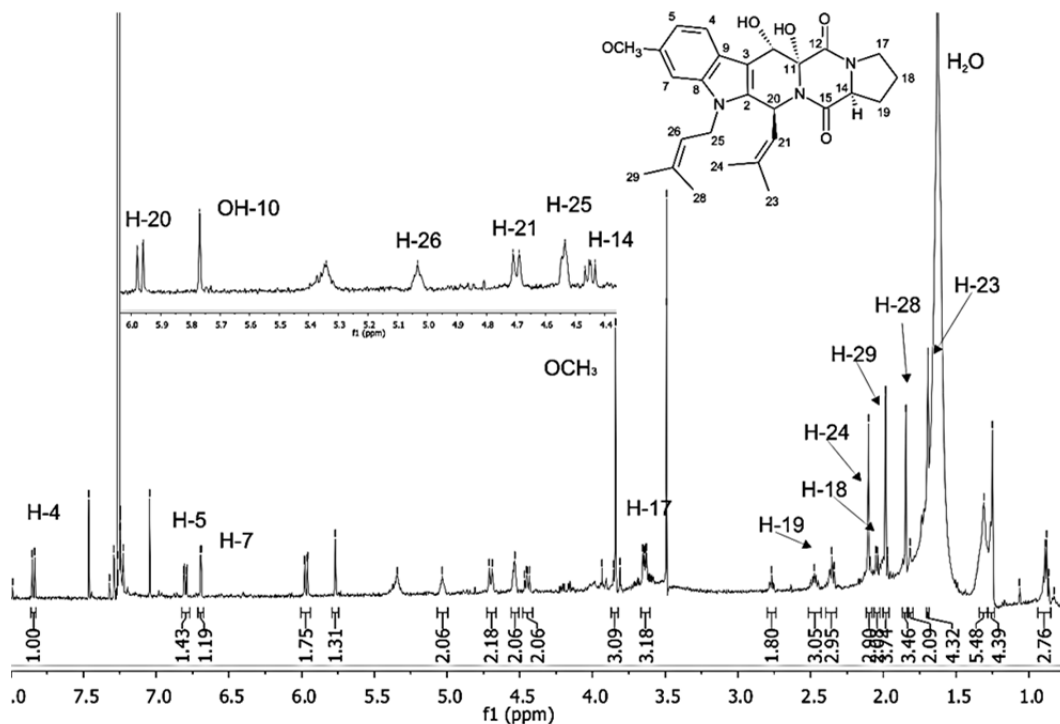


Abbildung 6-75: ¹H-NMR-Spektrum von Fumitremorgin B in CDCl₃ (500 MHz)

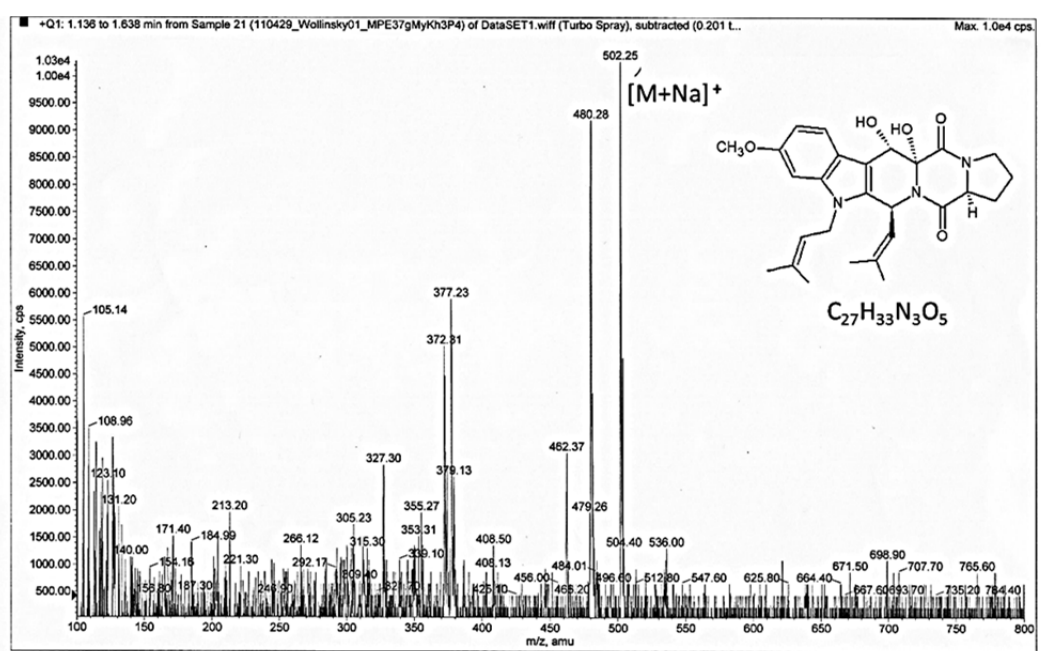
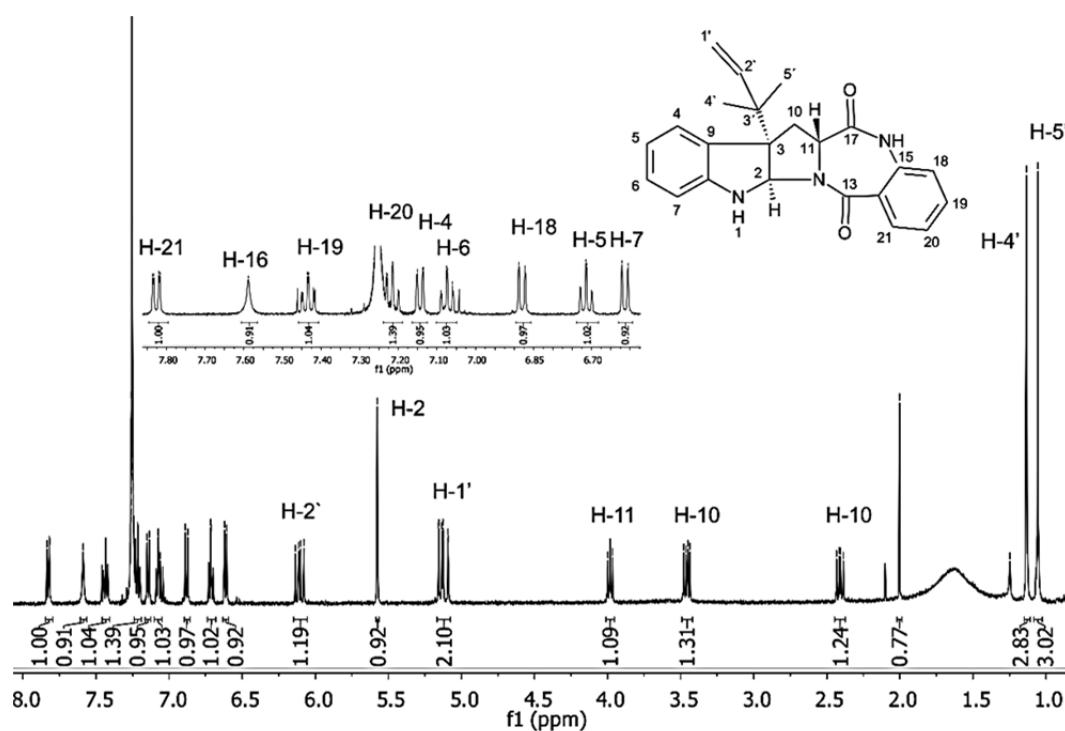
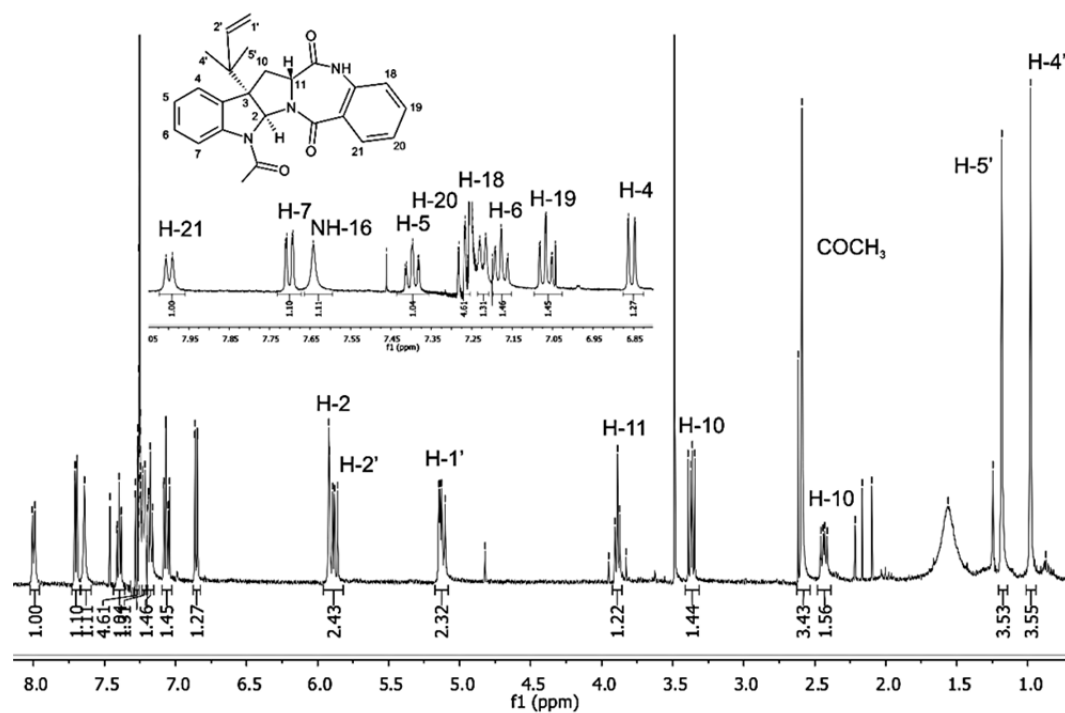


Abbildung 6-76: ESI-MS-Spektrum von Fumitremorgin B

6.7.2. Aszonalenin

Abbildung 6-77: ^1H -NMR-Spektrum von Aszonalenin in CDCl_3 (500 MHz)

6.7.3. Acetylaszonalenin

Abbildung 6-78: ^1H -NMR-Spektrum von Acetylaszonalenin in CDCl_3 (500 MHz)

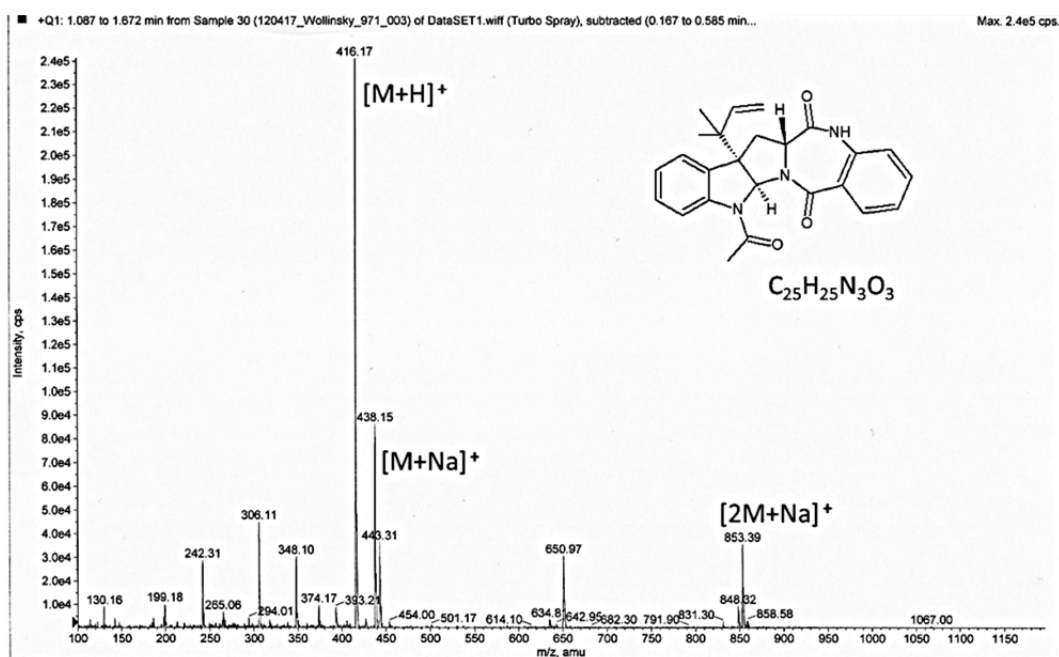
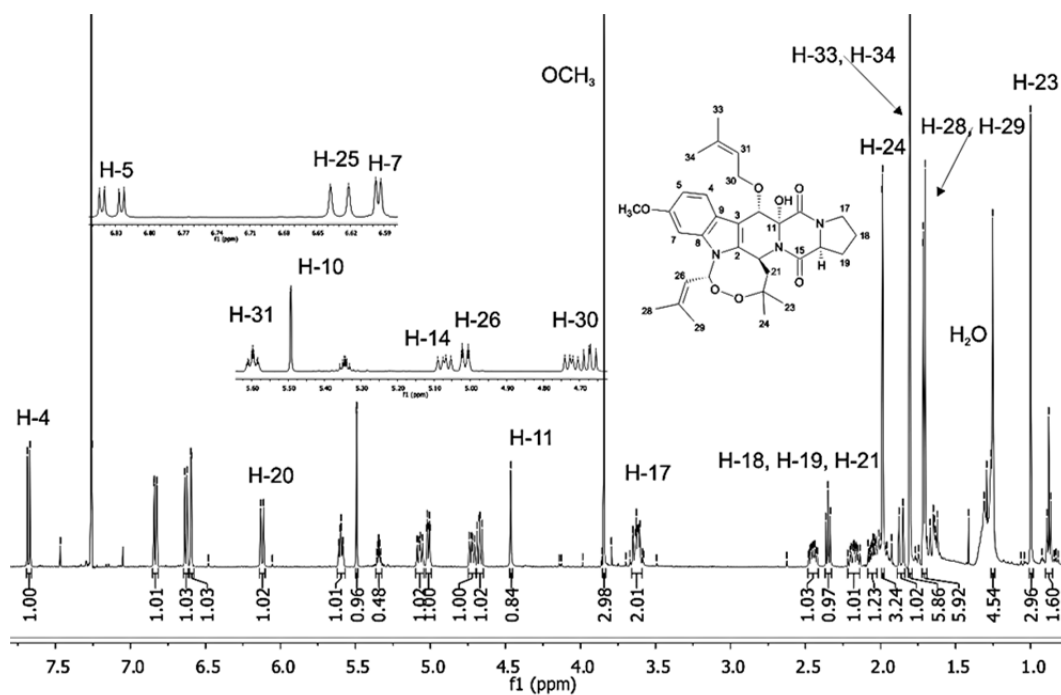


Abbildung 6-79: ESI-MS-Spektrum von Acetylazonalenin

6.7.4. Fumitremorgin A

Abbildung 6-80: ^1H -NMR-Spektrum von Fumitremorgin A in CDCl_3 (500 MHz)

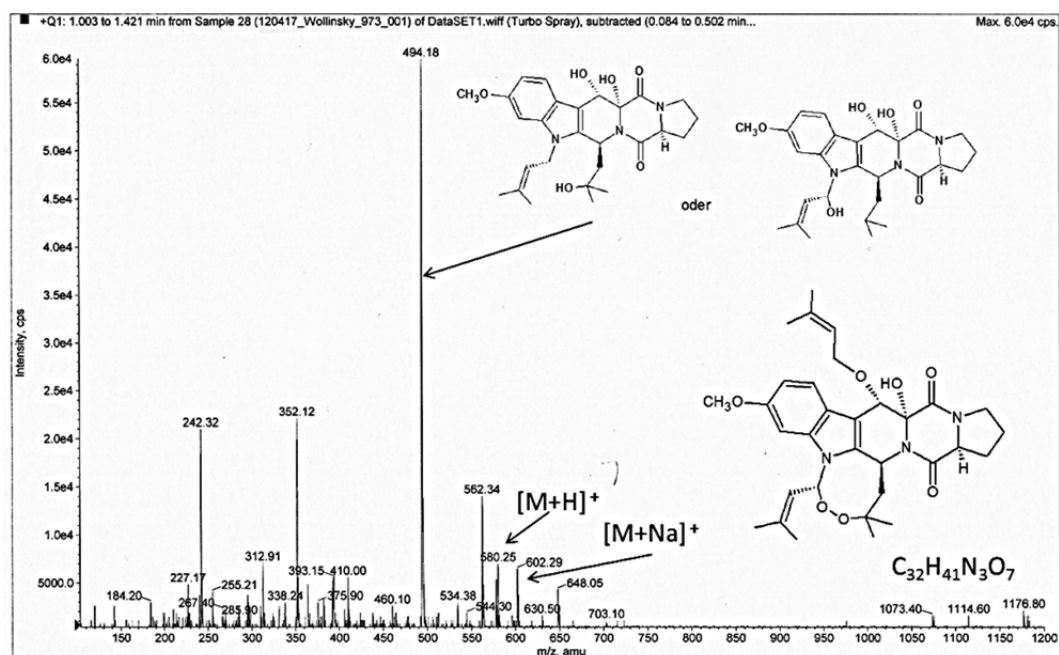
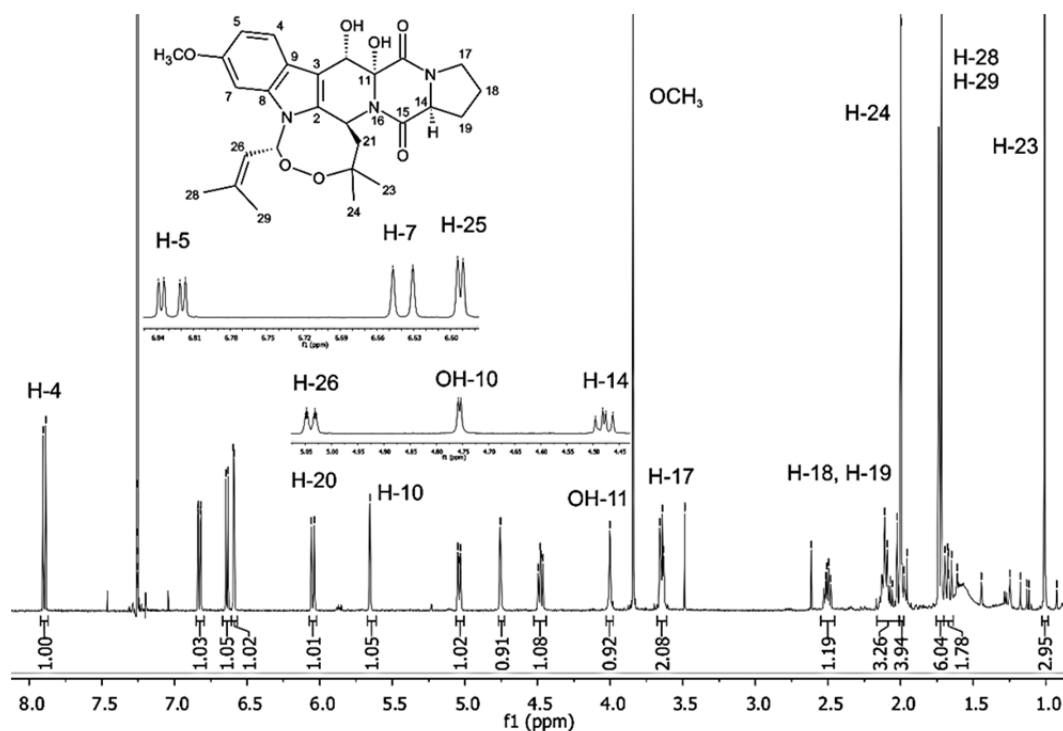


Abbildung 6-81: ESI-MS-Spektrum von Fumitremorgin A

6.7.5. Verruculogen

Abbildung 6-82: ¹H-NMR-Spektrum von Verruculogen in CDCl₃ (500 MHz)

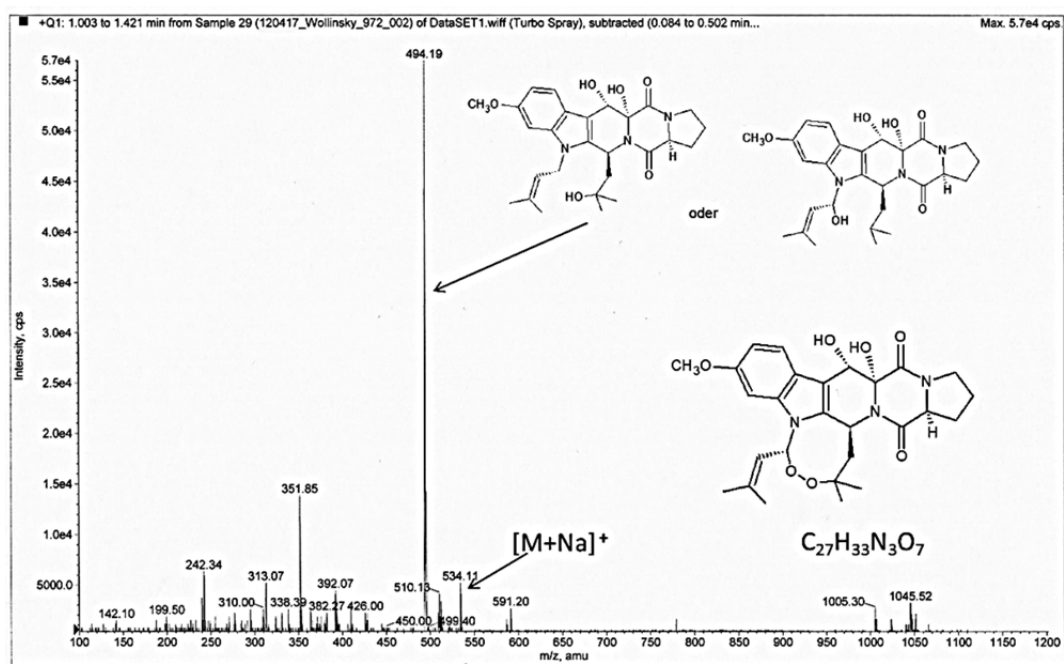
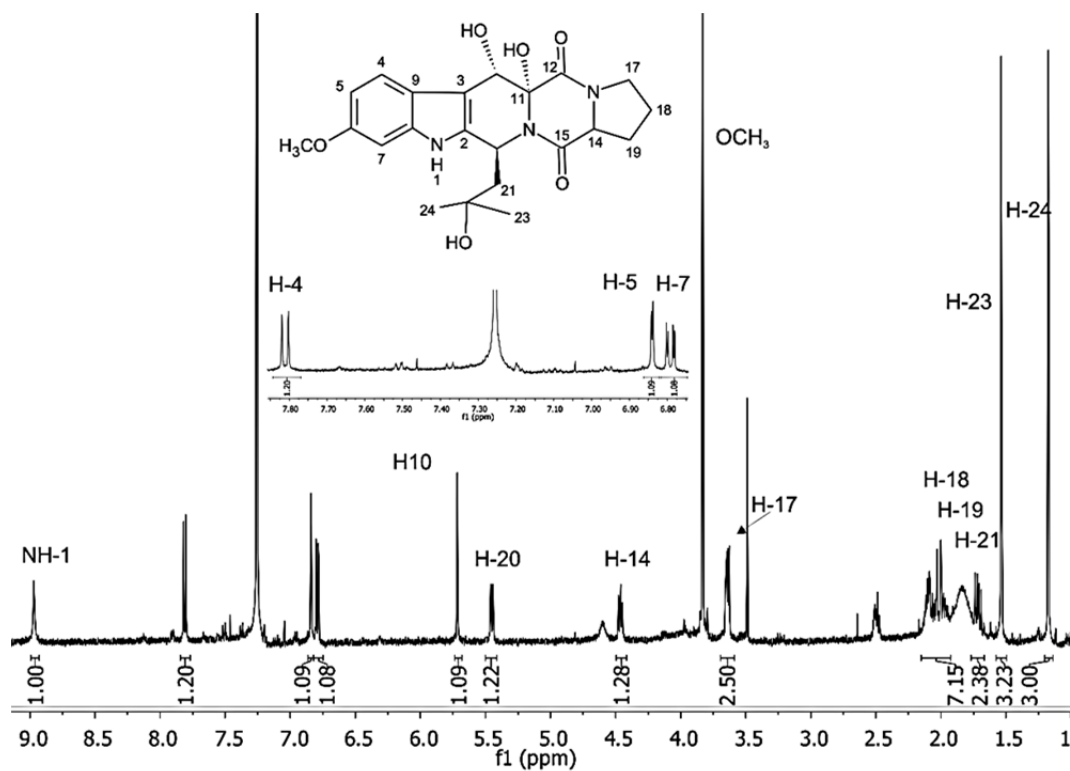


Abbildung 6-83: ESI-MS-Spektrum von Verrucologen

6.7.6. Verrucologen TR-2

Abbildung 6-84: 1H -NMR-Spektrum von Verrucologen TR-2 in $CDCl_3$ (500 MHz)

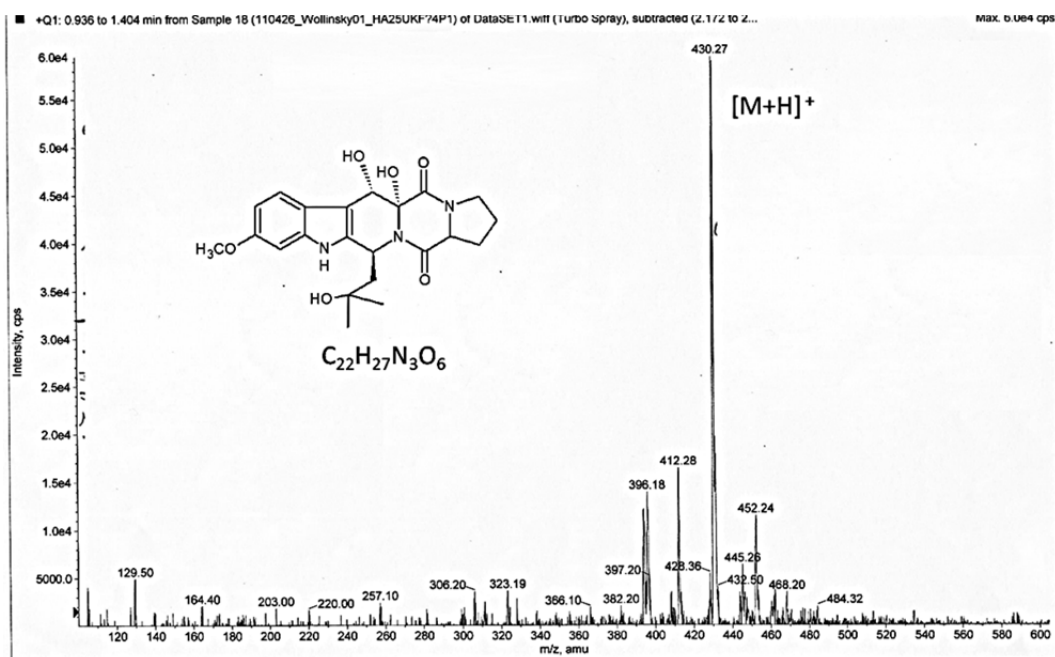
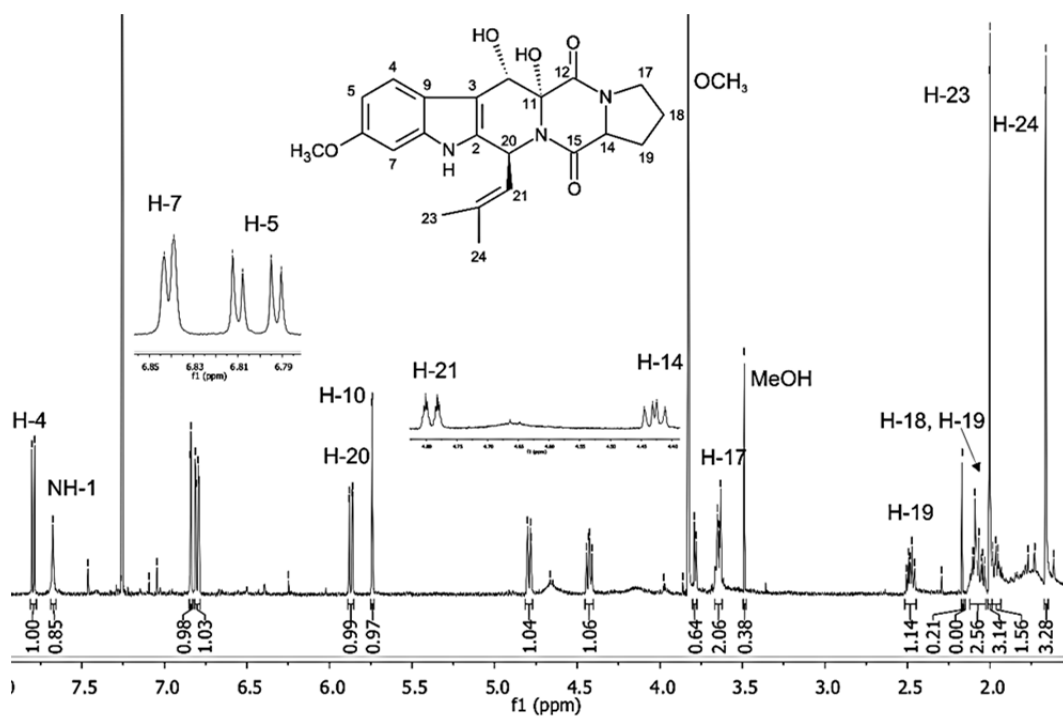


Abbildung 6-85: ESI-MS-Spektrum von Verrucologen TR-2

6.7.7. 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C

Abbildung 6-86: ¹H-NMR-Spektrum von 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C in CDCl₃ (500 MHz)

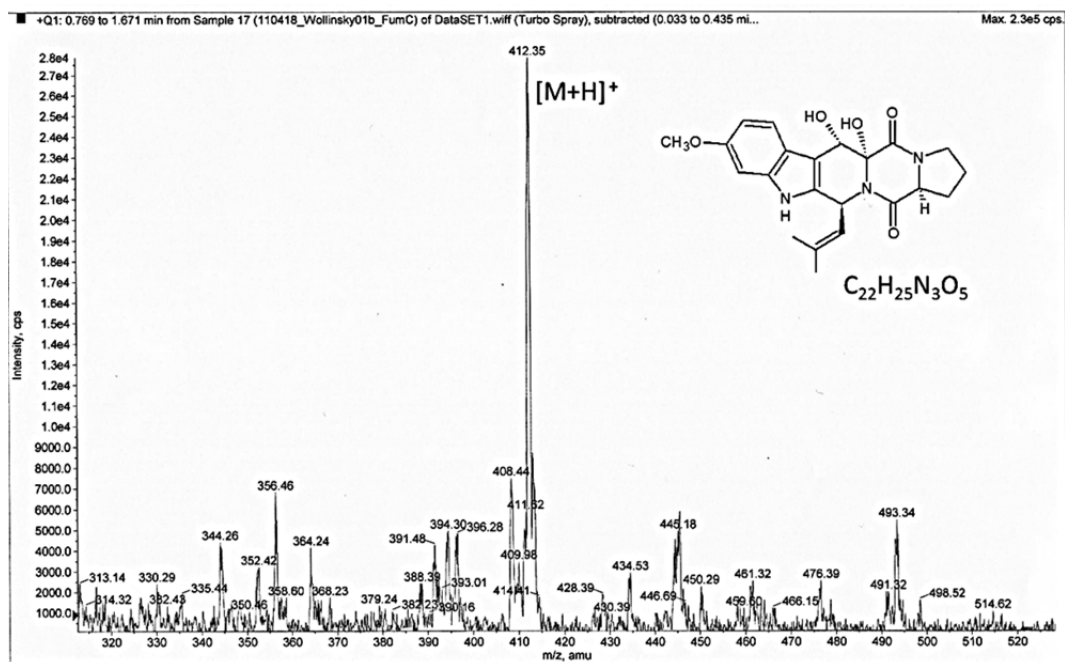
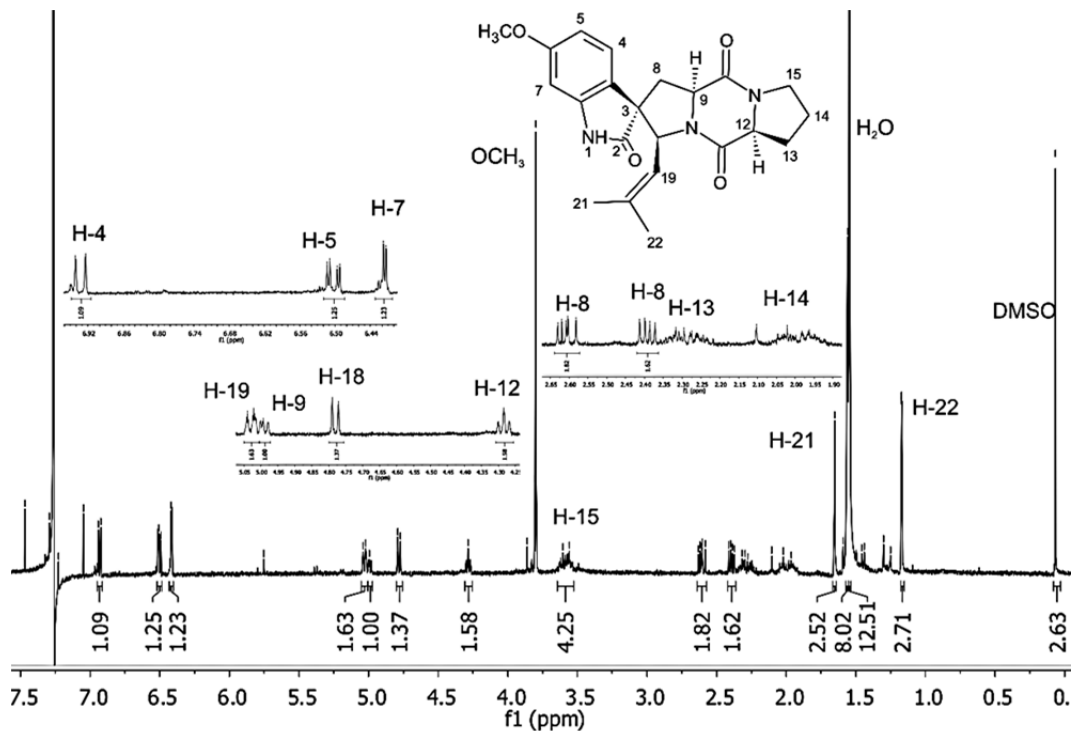


Abbildung 6-87: ESI-MS-Spektrum von 12,13-Dihydroxifumitremorgin C

6.7.8. Spirotryprostatin A

Abbildung 6-88: ^1H -NMR-Spektrum von Spirotryprostatin A in CDCl_3 (500 MHz)

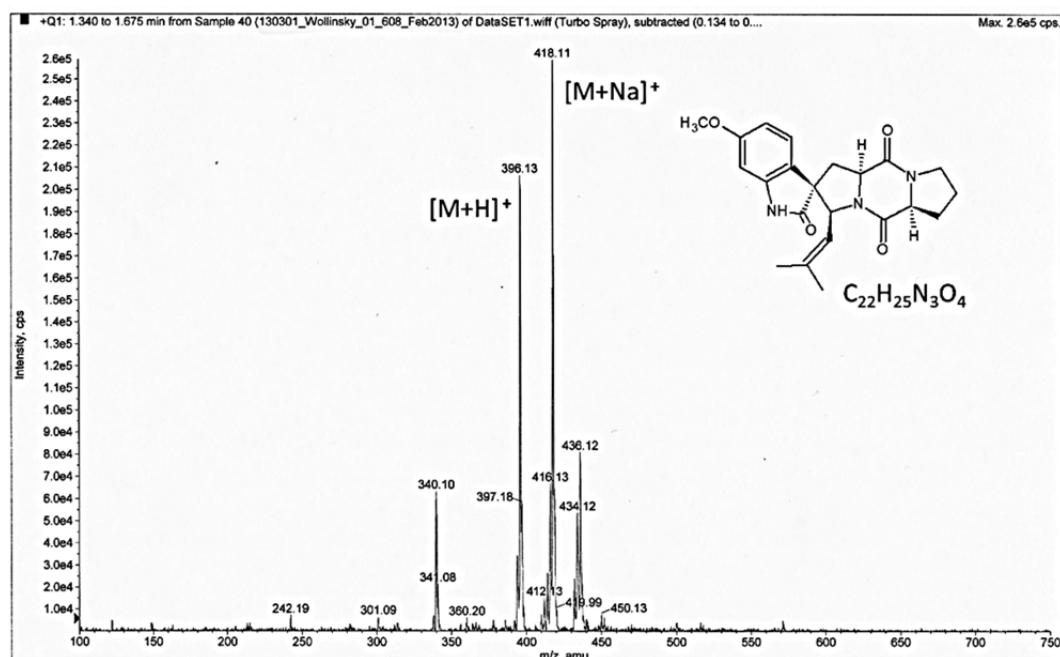
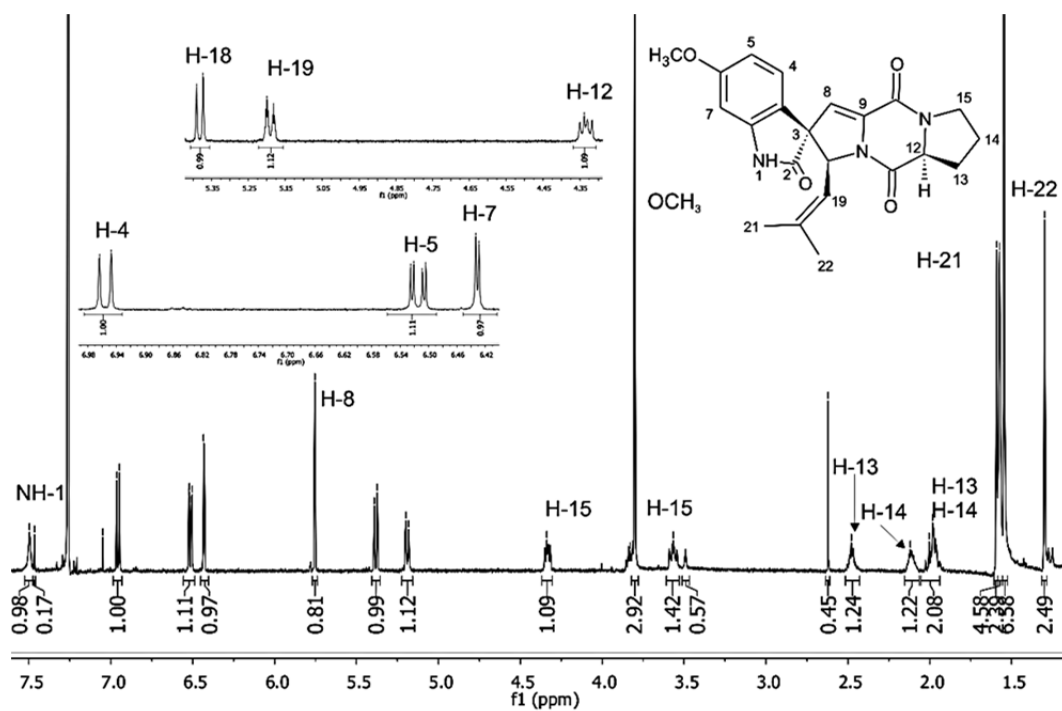


Abbildung 6-89: 3.1.ESI-MS-Spektrum von Spirotryprostatin A

6.7.9. 6-Methoxyspirotryprostatin B

Abbildung 6-90: 1H -NMR-Spektrum von 6-Methoxyspirotryprostatin B in $CDCl_3$ (500 MHz)

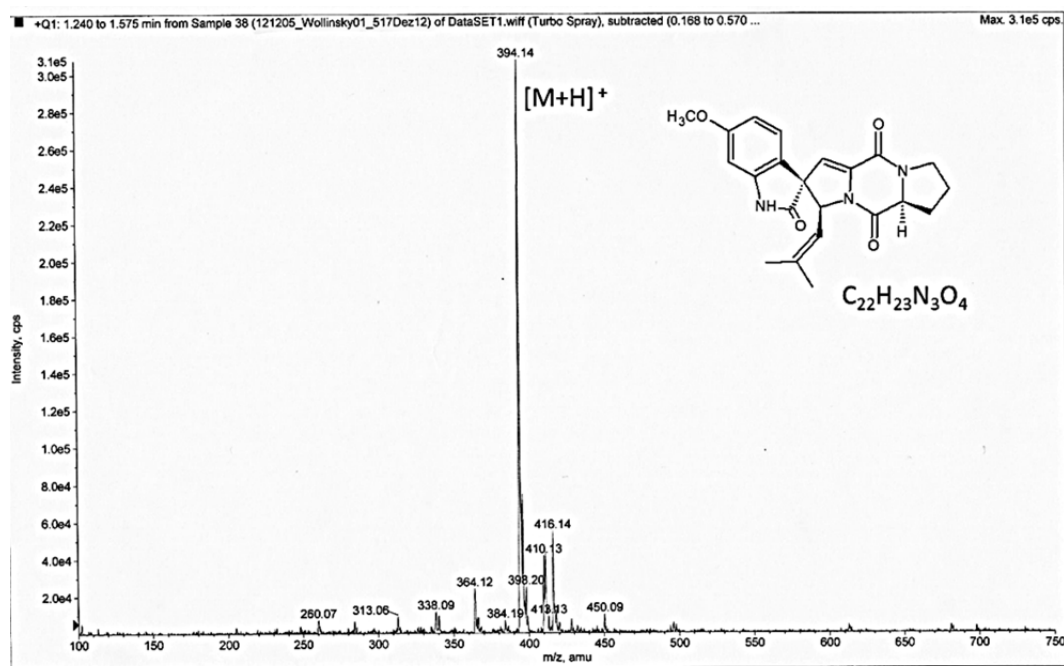
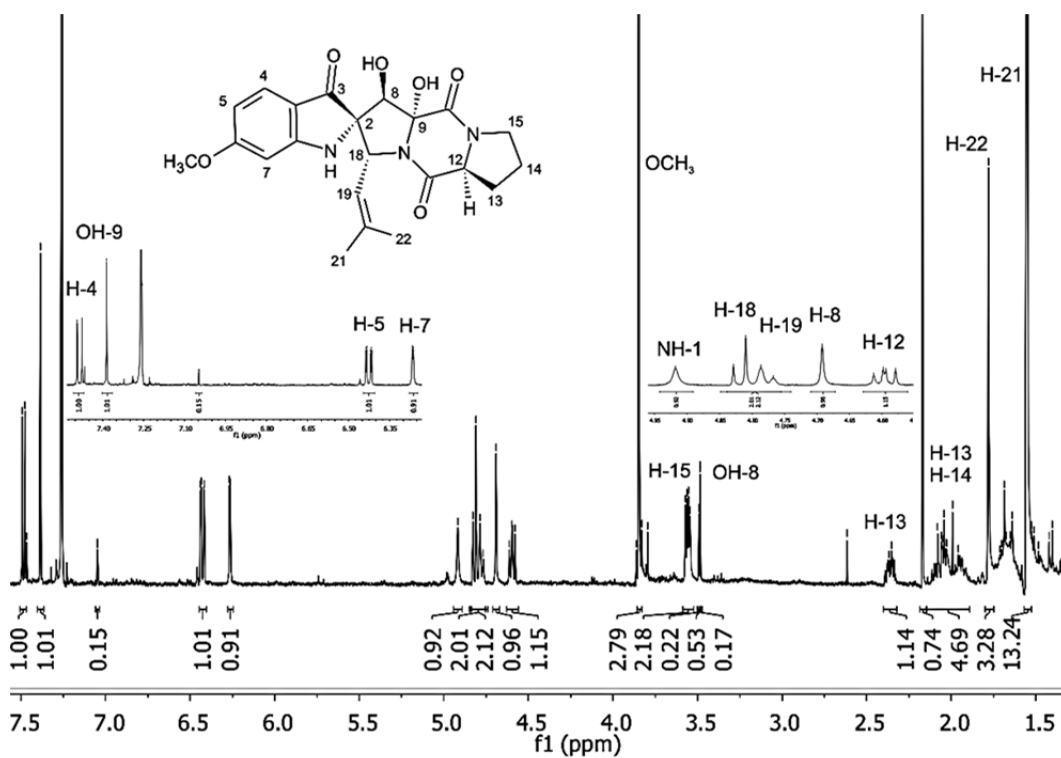


Abbildung 6-91: ESI-MS-Spektrum von 6-Methoxyspirotryprostatin B

6.7.10. Substanz 15

Abbildung 6-92: ¹H-NMR-Spektrum von Substanz 155 in CDCl₃ (500 MHz)

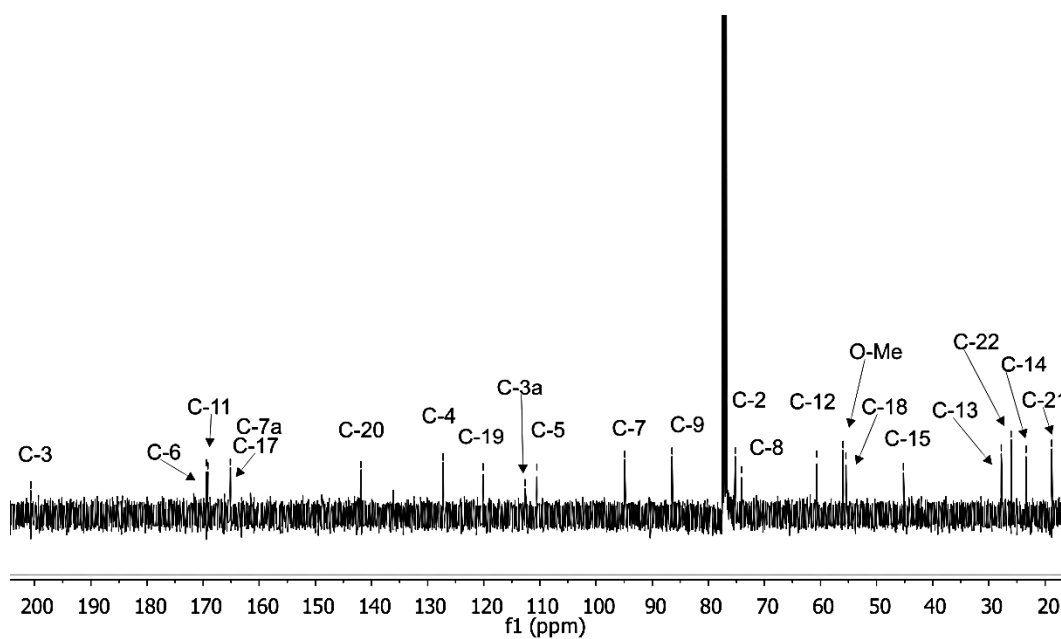


Abbildung 6-93: ^{13}C -NMR-Spektrum von Substanz 15 in CDCl_3 (500 MHz)

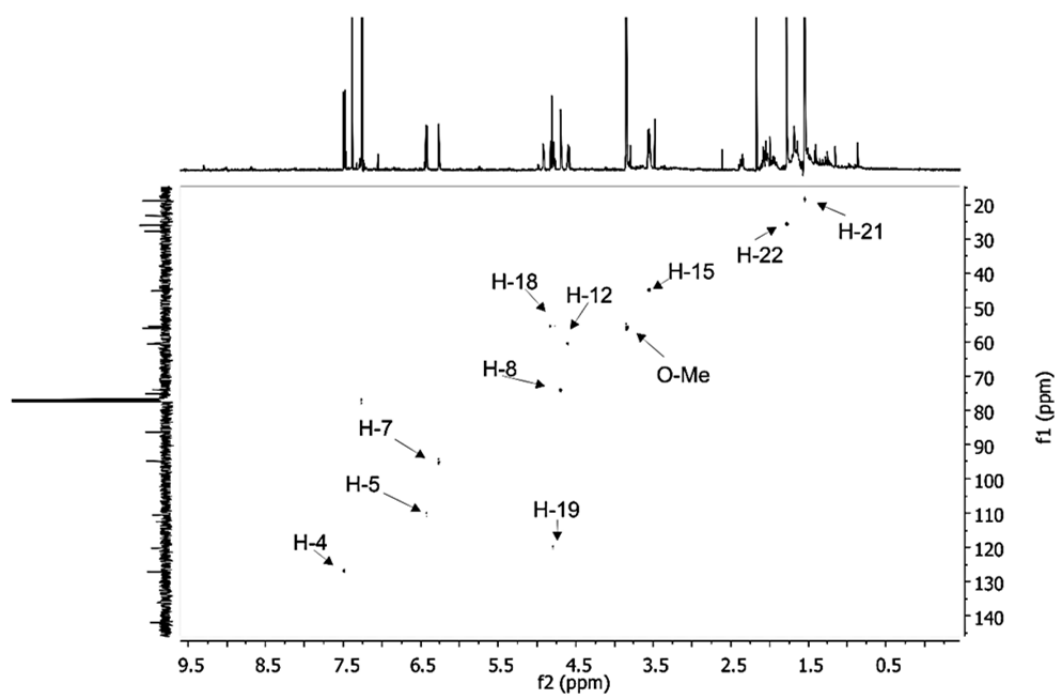
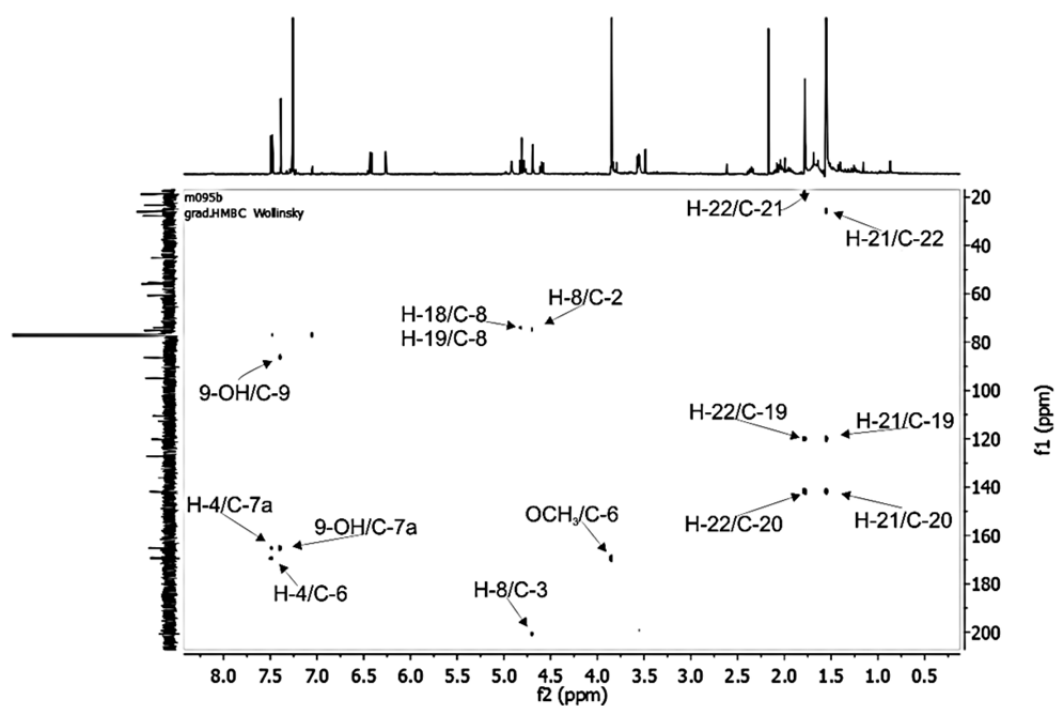
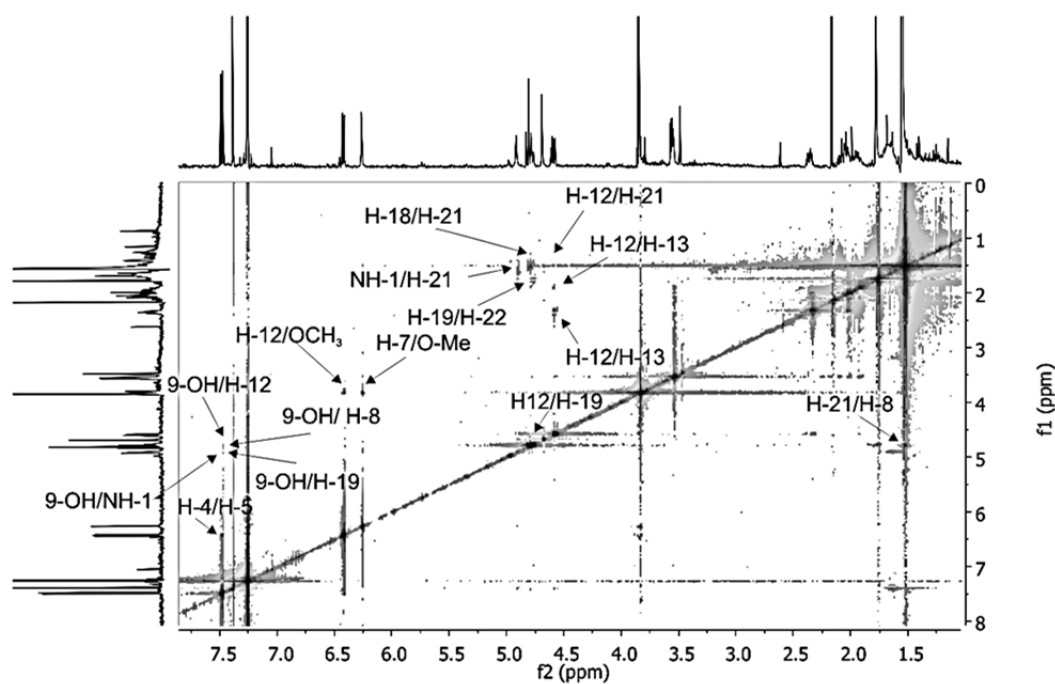


Abbildung 6-94: HSQC-Spektrum von Substanz 15 in CDCl_3 (500 MHz)

Abbildung 6-95: HMBC-Spektrum von Substanz 15 in CDCl₃ (500 MHz)Abbildung 6-96: NOESY-Spektrum von Substanz 15 in CDCl₃ (500 MHz)

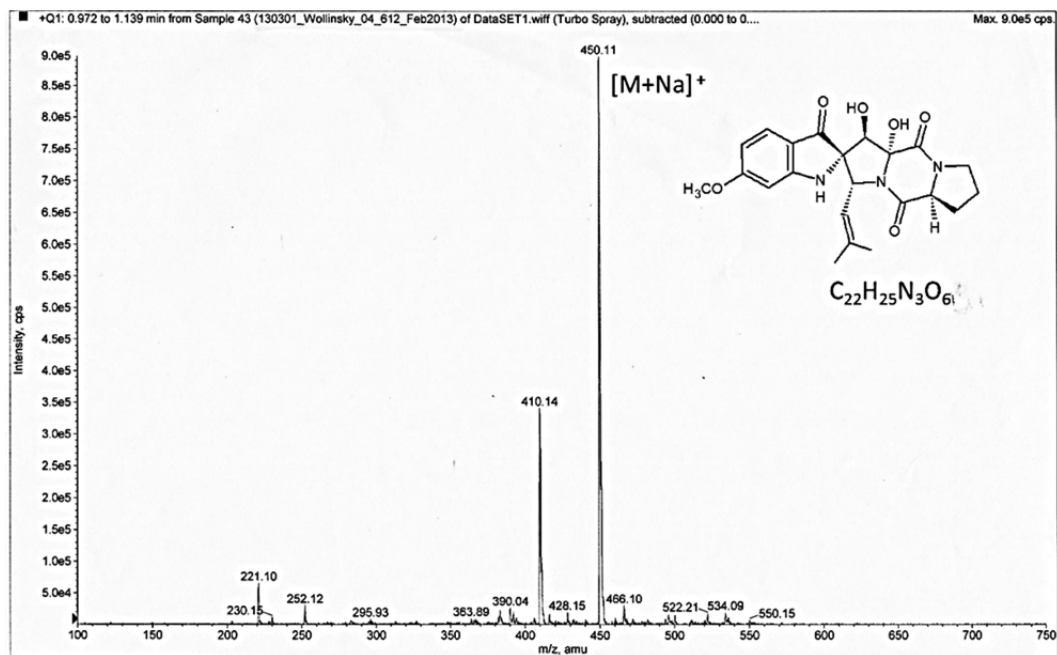


Abbildung 6-97: ESI-MS-Spektrum von Substanz 15

6.8. HPLC-MS (Zufütterung)

RT: 0.00 - 45.01

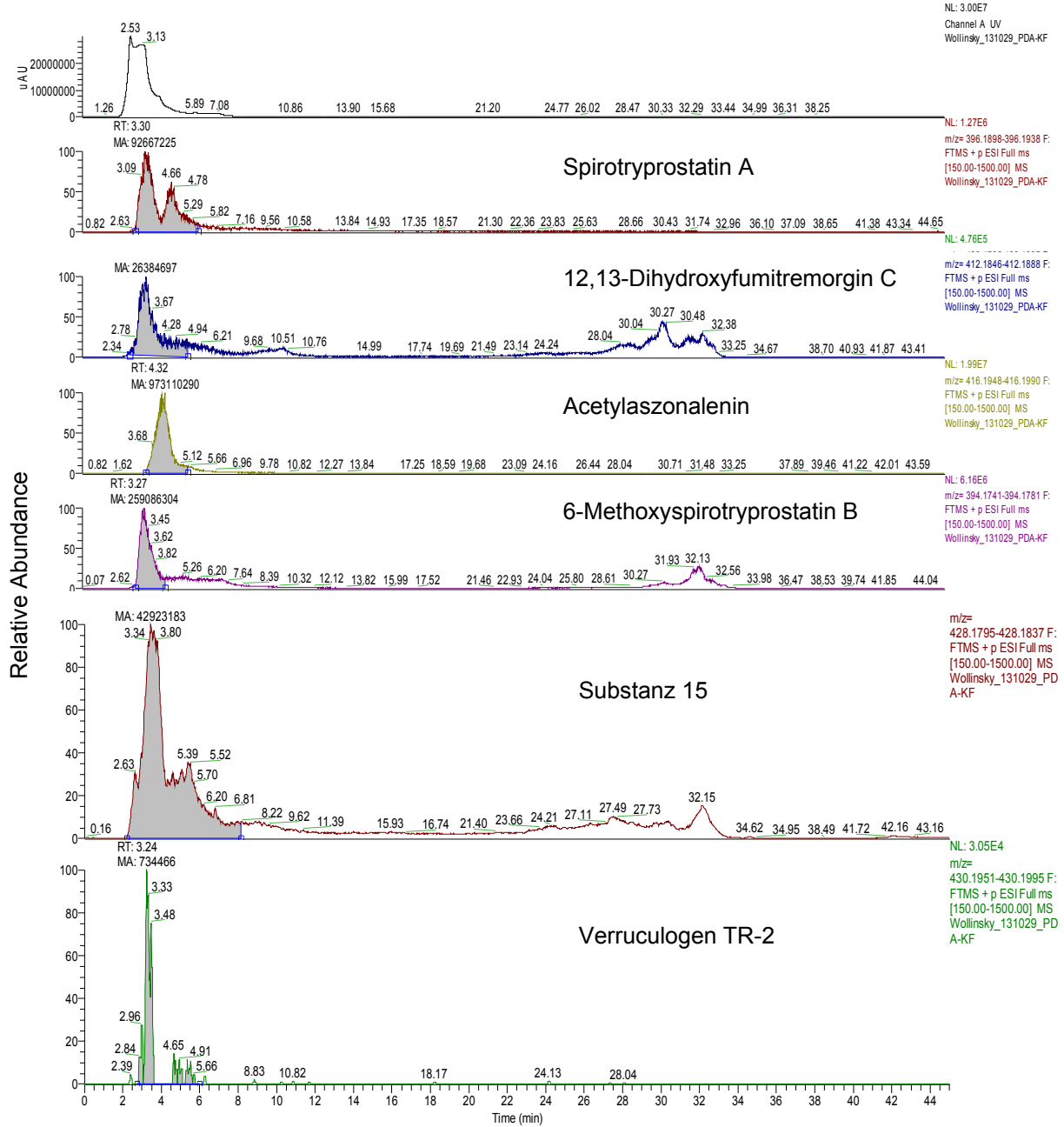


Abbildung 6-98: HPLC-MS-Chromatogramme des Kulturfiltratextrakte des PD-Mediums ohne Tryprostatin B

RT: 0.00 - 45.00

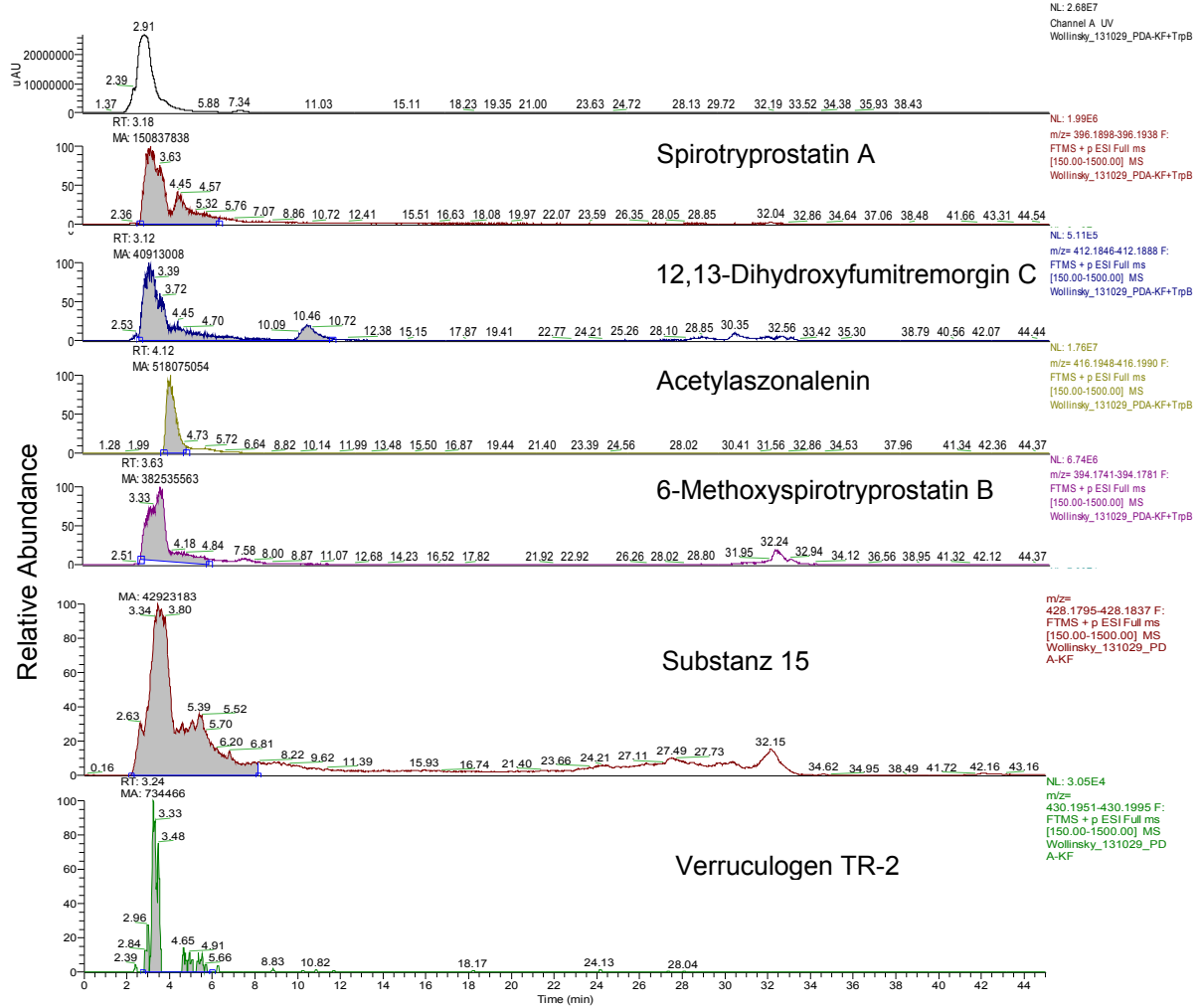


Abbildung 6-99: HPLC-MS-Chromatogramme des Kulturfiltratextraktes des PD-Mediums mit Tryprostatin B

VII. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Shu-Ming Li für die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung während meiner gesamten Promotionszeit. Ich konnte jederzeit zu ihm gehen und meine Probleme mit ihm erläutern und diskutieren, somit konnte ich mit neuen Gedankenansätzen und Motivation meine Arbeit erfolgreich weiterführen.

Herrn Prof Dr. Keusgen danke ich für Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Frau Dr. Xie möchte ich mich ganz herzlich für die ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, HSQC, HMBC und NOESY Messungen und ihre Hilfe bei den Auswertungen der C3-prenylierten Produkte von FtmPT1 bedanken.

Herrn Prof. Dr. Kassack und Frau Dr. Hamacher danke ich für die Durchführung der Zytotoxizitätstests meiner C2-prenylierten FtmPT1 Produkte.

Herrn Dr. Kämpchen und Herrn Newel aus der NMR-Abteilung danke ich für die sehr schnellen Messungen meiner zahlreichen NMR-Spektren. Frau Dr. Laufenberg und Frau Zitzer danke ich für die massenspektroskopischen Messungen (ESI-MS und HR-ESI-MS).

Bei Herrn Dr. Linne und seinem Mitarbeiter Herrn Bamberger möchte ich mich für die HPLC-MS Messungen und die Massenbestimmung des EAW19375-His₆ Proteins bedanken.

Der AG Meggers danke ich für die Bereitstellung des CD-Spektrometers einschließlich Küvette.

Bei meinen Kollegen möchte ich mich für das wunderbare Arbeitsklima sowie die Unterstützung, Aufmunterung und Hilfe während meiner gesamten Promotionszeit bedanken. Speziell die erholsamen und unterhaltsamen Mittagpausen in der Mensa mit Aili, Alex, Anne, Eddy, Johannes, Julia, Lena, Lennart, Ole, Soheil, Stefan und Sylwia werde ich so schnell nicht vergessen. Bei Kathrin und Carsten möchte ich mich noch einmal für die Bereitstellung ihrer Plasmide und ihre Unterstützung während der Protoplastierung bedanken.

Die Unterstützung meiner Familie war mir stets eine große Hilfe und ich bedanke mich sehr herzlich für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Mein herzlichster Dank gilt meinem Freund Christian, der mich trotz einer Entfernung von 200 km stets unterstützt und ermutigt hat. Danke dass du immer für mich da bist.

VIII. Curriculum vitae